

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5991922号
(P5991922)

(45) 発行日 平成28年9月14日 (2016. 9. 14)

(24) 登録日 平成28年8月26日 (2016. 8. 26)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/113 (2010. 01)
A 6 1 K 48/00 (2006. 01)
A 6 1 K 31/7088 (2006. 01)
A 6 1 P 31/16 (2006. 01)
A 6 1 K 45/00 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 Z N A G
 A 6 1 K 48/00
 A 6 1 K 31/7088
 A 6 1 P 31/16
 A 6 1 K 45/00

請求項の数 22 (全 96 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2012-539038 (P2012-539038)
 (86) (22) 出願日 平成22年11月12日 (2010. 11. 12)
 (65) 公表番号 特表2013-510584 (P2013-510584A)
 (43) 公表日 平成25年3月28日 (2013. 3. 28)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2010/056613
 (87) 国際公開番号 W02011/060320
 (87) 国際公開日 平成23年5月19日 (2011. 5. 19)
 審査請求日 平成25年11月11日 (2013. 11. 11)
 (31) 優先権主張番号 61/261, 278
 (32) 優先日 平成21年11月13日 (2009. 11. 13)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/292, 056
 (32) 優先日 平成22年1月4日 (2010. 1. 4)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 501237039
 サレプタ セラピューティクス, インコ
 ーポレイテッド
 アメリカ合衆国 オレゴン 97333,
 コーバリス, エス. ダブリュー. リサ
 ーチ ウェイ 4575, スイート 2
 O O
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (72) 発明者 アイブルセン, パトリック エル.
 アメリカ合衆国 オレゴン 97330,
 コーバリス, ノースウェスト フェア
 オークス プレイス 5902
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アンチセンス抗ウイルス性化合物およびインフルエンザウイルス感染を処置するための方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

単離された抗ウイルス性アンチセンスオリゴヌクレオチドであって：

a) ヌクレアーゼ抵抗性骨格；

b) 20ヌクレオチド塩基、ならびに

c) インフルエンザウイルスのM1もしくはM2 mRNAのAUG開始コドンの周辺の45塩基のウイルス標的領域にハイブリダイズする標的化配列を含み、

該オリゴヌクレオチドが、(i) 配列番号12または13から構成される標的化配列を含むモルホリノオリゴヌクレオチドであるか；

(i i) 1つ以上のロックト核酸 (LNA) を含み、配列番号63から構成される標的化配列を含むか；

(i i i) 配列番号48から構成される標的化配列を含むペプチド核酸 (PNA) であるか、または

(i v) 2'-O-メチル残基を含み、配列番号12から構成される標的化配列を含む、

単離された抗ウイルス性アンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 2】

前記オリゴヌクレオチドが、前記ウイルス標的領域とヘテロ二重鎖構造を形成する能力により特徴付けられ、ここで、前記ヘテロ二重鎖構造が：

10

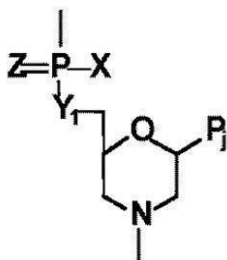
20

a) 前記ウイルスのプラスセンス鎖および前記オリゴヌクレオチドから構成され、そして
 b) 少なくとも 45 °C の解離 T_m により特徴付けられる、
 請求項 1 に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 3】

前記オリゴヌクレオチドが、モルホリノオリゴヌクレオチドであり、該モルホリノオリゴヌクレオチドのサブユニットが、以下の構造：

【化 16】



10

に従うリン含有結合によって結合されており、

ここで、 $Y_1 = O$ であり、 $Z = O$ であり、 P_j は、塩基特異的な水素結合によってポリヌクレオチド中の塩基に結合するのに有効なプリンまたはピリミジン塩基対形成部分であり、そして X は、アルキル、アルコキシ、チオアルコキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノまたは 1-ピペラジンである、

20

請求項 1 または 2 に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 4】

前記ジアルキルアミノの各アルキルが、 $C_1 - C_6$ アルキルから選択される、請求項 3 に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 5】

リン含有結合の少なくとも 2 つかつ総数の半数以下について、 X は 1-ピペラジンであり、そして、残りの結合は $X = NR_2$ であり、ここで、各 R は、独立して水素またはメチルである、請求項 3 に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 6】

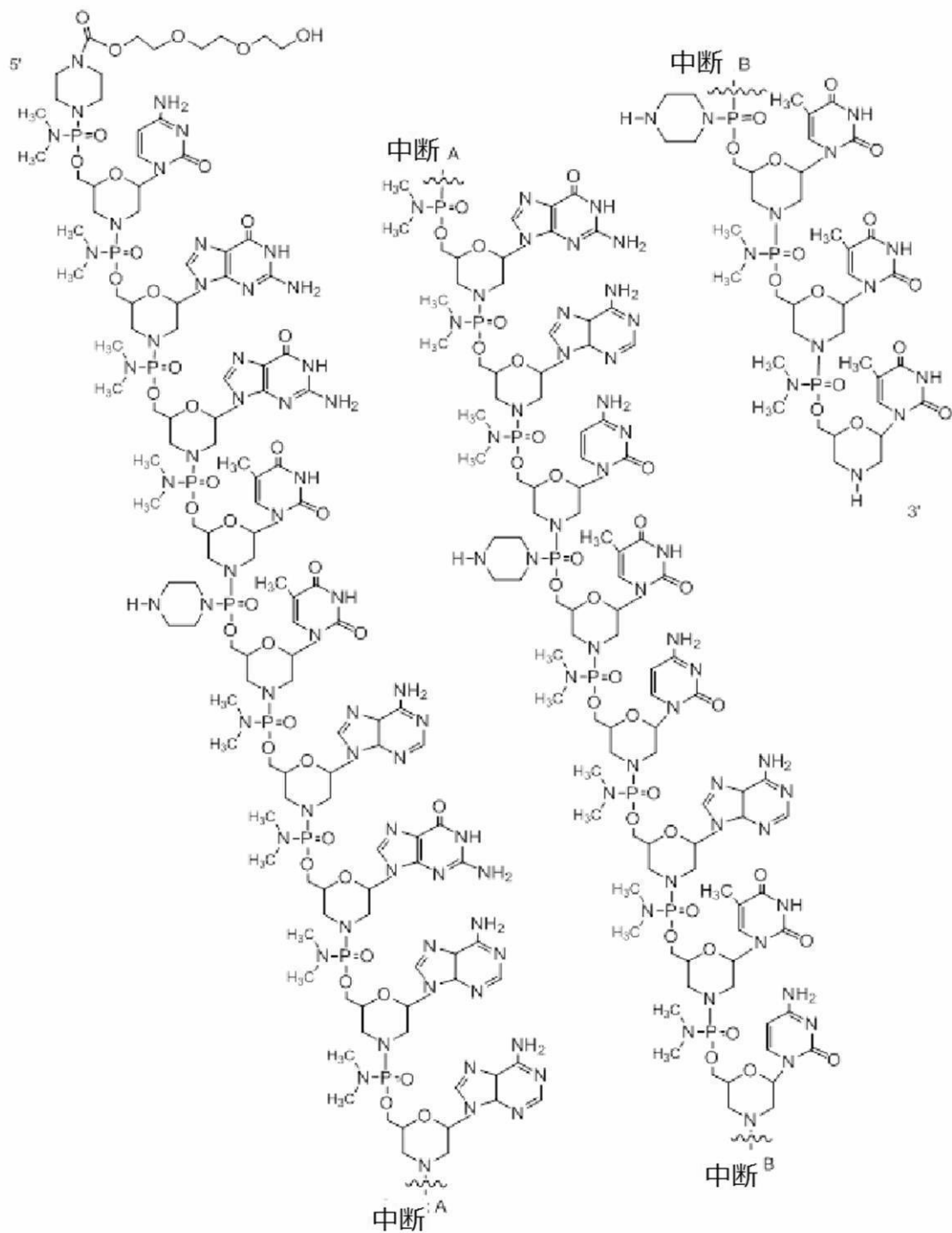
前記モルホリノオリゴヌクレオチドが、配列番号 13 の標的化配列を含み、かつ配列番号 13 において (+) で示されるような 3 つのリン含有結合を有し、ここで X は、1-ピペラジンである、請求項 5 に記載のオリゴヌクレオチド。

30

【請求項 7】

以下の構造：

【化 1】



からなる、請求項 1 に記載の抗ウイルス性アンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 8】

前記ウイルス標的領域が、配列番号 1、2、および 5～8 のうちのいずれか 1 つ以上を含む、請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 9】

前記オリゴヌクレオチドが、本質的に配列番号 4～8 からなる標的化配列を含むペプチド核酸（PNA）である、請求項 1 に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 10】

1つ以上のLNAサブユニットを含み、かつ本質的に配列番号63からなる標的化配列を含む、請求項1に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項11】

前記オリゴヌクレオチドが、宿主細胞内への前記化合物の取り込みを増大させるアルギニンリッチポリペプチドに結合体化されている、請求項1～10のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項12】

前記アルギニンリッチポリペプチドが、配列番号115～128からなる群から選択される、請求項11に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項13】

インフルエンザウイルスの複製の減少における使用のための組成物であって、前記組成物は、請求項1～12のいずれか1項に記載の抗ウイルス性アンチセンスオリゴヌクレオチドを含み、そして前記組成物は、インフルエンザウイルスに感染した細胞と接触されることを特徴とする、組成物。

【請求項14】

前記細胞が、被験体内の細胞であり、前記組成物は、前記被験体に投与されることを特徴とする、請求項13に記載の使用のための組成物。

【請求項15】

前記被験体が、二次的細菌感染を有し、前記組成物は、細菌用抗生物質と別個に、またはそれと併用して投与されることを特徴とする、請求項14に記載の使用のための組成物。

【請求項16】

前記二次的細菌感染が、連鎖球菌性肺炎への感染である、請求項15に記載の使用のための組成物。

【請求項17】

前記抗生物質が、ベータラクタムである、請求項15に記載の使用のための組成物。

【請求項18】

前記抗生物質が、ペニシリン、アモキシシリン、セファロスポリン、クロラムフェニコールおよびクリンダマイシンから選択される、請求項15に記載の使用のための組成物。

【請求項19】

CD200またはCD200レセプターをコードするRNA分子を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドと別個に、またはそれと併用して投与されることをさらに特徴とする、請求項14～18のいずれか1項に記載の使用のための組成物。

【請求項20】

請求項1～12のいずれか1項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドおよび薬学的に許容され得るキャリアを含む、薬学的組成物。

【請求項21】

細菌用抗生物質をさらに含む、請求項20に記載の薬学的組成物。

【請求項22】

CD200またはCD200レセプターをコードするRNA分子を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドをさらに含む、請求項20に記載の薬学的組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願への相互参照

本願は、米国特許法第119条(e)項の下、2009年11月13日に出願された米国仮特許出願第61/261,278号、2010年1月4日に出願された米国仮特許出願第61/292,056号、および2010年8月26日に出願された米国仮特許出願第61/377,382号の利益を主張し、この米国仮特許出願の全体の内容は、本明細書中に参考として援用される。

【0002】

10

20

30

40

50

配列表に関する陳述

本願に付随する配列表は、紙の写しの代わりにテキスト形式で提供しており、本明細書によって本明細書中に参考として援用される。その配列表を含むテキストファイルの名称は、120178__456PC__SEQUENCE__LISTING.txtである。このテキストファイルは、33KBであり；2010年11月11日に作成され；EFS-Webを介して電子的に提出されている。

【0003】

発明の分野

本発明は、インフルエンザウイルス感染を処置する際に使用するためのアンチセンスオリゴヌクレオチド、およびそのオリゴヌクレオチドを使用した抗ウイルス処置方法に関する。

【背景技術】

【0004】

発明の背景

インフルエンザウイルスは、有史時代全体を通してヒトの大量死および罹患の主因であり続けている。インフルエンザAウイルスへの感染により、世界中で毎年、数百万の重篤疾病の症例および500,000もの死亡数が生じる。流行は、重症度が大きく異なるが一定間隔で発生し、いつも高齢者集団において最も高い頻度で、著しい死亡率および罹患率をもたらす。マッチしたインフルエンザ株に対するワクチンは、健常成人の60～80%において疾病を予防することができるが、高リスク群における防御の割合は、それよりもかなり低い。さらに、ワクチン接種は、予想外の株に対しては防御しない（例えば、1997年の香港ならびに2003年および2004年の欧州および東南アジアにおけるH5およびH7トリインフルエンザの大流行）。現行の抗インフルエンザ薬は、防御および治療効果を提供する能力に限りがある（Cox and Subbarao 1999；Cox and Subbarao 2000）。

【0005】

インフルエンザAは、マイナス極性の分節型RNAウイルスである。ゲノムセグメントは、4つのタンパク質：3つのポリメラーゼポリペプチド（PA、PB1およびPB2）およびNP（核タンパク質）の複合体によって複製される。8つすべてのゲノムセグメントの5'および3'末端の配列領域は、遺伝子型内で高度に保存されている（Strauss and Strauss 2002）。

【0006】

インフルエンザAウイルスは、それらの表面糖タンパク質の抗原性および遺伝的性質に従って亜型に分類され得る；15種の赤血球凝集素（HA）および9種のノイラミニダーゼ（NA）の亜型が、今までに同定されている。鳥類の宿主からは、すべての公知のHA亜型およびNA亜型を有するウイルスが単離されているが、ヒトではH1N1（1918）、H2N2（1957/58）およびH3N2（1968）亜型のウイルスだけが広範囲に及ぶ流行に関連している（Strauss and Strauss 2002）。

【0007】

H5N1インフルエンザウイルスがヒトに伝染し、感染した18人中6人が死亡した1997年以降、トリインフルエンザウイルスが哺乳動物に複数伝染している。ホールウイルス（whole virus）が直接伝染しているか、またはそのトリインフルエンザウイルスの遺伝子セグメントを哺乳動物株が獲得しているかのいずれかである。アジアの広範囲でH5N1ウイルスに家禽が感染したことによって、この亜型がヒトからヒトに伝播して、種間伝播を確立し得るという懸念が大きくなっている。種々のタイプのインフルエンザウイルスが感染することができる種は、種々の形態のウイルスの糖タンパク質（HA、NA）によって決定される。これにより、鳥類とヒトとの間に容易に乗り越えられない大きな種の壁がもたらされる。しかしながら、ブタは、両方のタイプのウイルスに感染することができる「混合ポット」を提供し、それによりトリのウイルスがヒトに運搬されてしまう。個別のブタ細胞が、トリのインフルエンザウイルスとヒトのインフルエンザウ

10

20

30

40

50

イルスの両方に同時に感染するとき、トリのHA遺伝子型を有するが容易にヒトに感染する組換え型が出現し得る。トリのHAは、ブタに感染することができるが、ヒトには感染できない。ブタでは、ゲノムセグメントのパッケージングの際に、いくつかのトリのセグメントならびにヒトのHAおよび／またはNAセグメントを有するウイルスを作り出すことができる (Cox and Subbarao 2000)。

【0008】

インフルエンザウイルスは、ヒトおよび動物（例えば、ブタ、鳥類、ウマ）に感染し、急性の呼吸器疾患を引き起こし得る。インフルエンザウイルスに対して有効なワクチンの製造が数多く試みられている。しかしながら、特に長期ベースでは、完全に成功したものはない。これは、インフルエンザウイルスゲノムが分節性であるという特徴（これにより、セグメントの再集合によって数多くの型を生じさせることが可能である）に少なくとも部分的に起因し得る。例えば、動物のインフルエンザウイルスとヒトのインフルエンザウイルスとの間でRNAセグメントが交換され得、それにより、新しい抗原性の亜型が両方の集団に導入され得ると示唆されている。したがって、長期のワクチン接種アプローチは、新しい亜型の出現が原因で失敗している（抗原「シフト」）。さらに、ウイルスの表面タンパク質である赤血球凝集素およびノイラミニダーゼは、絶えず小さい抗原性の変化を起こしている（抗原「ドリフト」）。この高い変化の程度は、なぜ特定のインフルエンザウイルスに対して生じる特異免疫が新しいバリエーションに対する防御を確立しないのかを説明する。ゆえに、代替の抗ウイルスストラテジーが必要とされている。インフルエンザBおよびCウイルスは、A型よりも臨床疾患を引き起こさないが、新しい抗ウイルス薬は、これらの物質によって引き起こされる感染を抑える際にも役立つはずである。

【0009】

鳥類に天然に存在するインフルエンザウイルスは、トリインフルエンザ（鳥インフルエンザ）と呼ばれる。鳥類は、それらのウイルスを腸内に保有するが、通常、その感染によって病気にならない。しかしながら、飼育されているニワトリ、アヒルおよびシチメンチョウに感染して疾病および死さえも引き起こす鳥インフルエンザを渡り鳥が運び得る。トリインフルエンザは、容易にヒトに感染しないが、飼育されている鳥類との接触などヒトへの曝露が高頻度であるとき、ヒトへの感染が起きる。危険な鳥インフルエンザ（H5N1）が、1961年に南アフリカのアジサシにおいて初めて同定され、死に至らしめる恐れのある型のインフルエンザとして同定された。H5N1の大流行は、2003年後期および2004年にアジアの8つの国において発生した。当時、これらの国の1億羽を超える鳥類が、死亡するか、または大流行を抑制するために殺された。2004年の6月のはじめに、現在も進行中のH5N1の新しい致死的な大流行がアジアで報告された。H5N1のヒトへの感染は、タイ、ベトナムおよびカンボジアで観察され、その死亡率は約50パーセントだった。これらの感染は、主に、感染した家禽と接触したヒトから生じたが、H5N1のヒトからヒトへの伝播が数例生じていた。

【0010】

1998年以来、ブタ由来のセグメント（HA、NP、NA、MおよびNS）、ヒト由来のセグメント（PB1）および鳥類由来のセグメント（PB2およびPA）を有するトリプル再集合体インフルエンザA（H1）ウイルスが出回っている。新たに報告されたブタ起源の新規のインフルエンザA（2009H1N1）ウイルス（S-OIV）は、進行中の世界的な疾患の大流行に関与しており、このウイルスは、ユーラシアのブタのウイルス（Eurasian swine virus）のノイラミニダーゼ（NA）セグメントおよびマトリックス（M）セグメントと再集合した既存のウイルスの遺伝因子を含むトリプル再集合体ウイルスである（S-OIV Investigation Team, 2009）。以前のインフルエンザA（H1）トリプル再集合体ウイルスは、時折ヒトに伝染したがヒトからヒトへの伝播は効率的でなかったが、この新しいS-OIVは、ヒトからヒトへの伝染が非常に効率的である。最近、検査で確認された3440例のS-OIV感染が、29の国から報告された。この大流行は、メキシコで始まり、合計1364例が記録に残され、45人が死亡した（致死率3.3%）。メキシコ以外では、3人の死亡

しか報告されなかった（致死率0.1%）。この死亡率の地理的不均衡の理由は、現時点では明らかでない。

【0011】

そのS-OIVは、現在、ノイラミニダーゼインヒビターであるオセルタミビルおよびザナミビルに感受性であるが、季節性インフルエンザは、以前に、ノイラミニダーゼインヒビター耐性を付与する変異を発生させると記録に残されている。S-OIVは、季節性インフルエンザウイルスとしてヒトH1にとって代わるのか、またはS-OIVは、なおも別のインフルエンザ株と再集合して別の新しいバリエーションを作り出すのか？それは、より致死性になるように進化するか？これらの不確実性は、新しいウイルスの同定から新しいワクチンの製造および流通までの時間差によって、一層大きくなる。さらに、十分に新

10

【0012】

(a) このウイルスが、継続的な低レベルの抗原ドリフトと、頻度は低いが予測不可能な大きな抗原シフトとの両方を起こすことにより汎発流行病に至らしめる公知の性質があること、(b) 株が妥当にマッチしているときでさえ、ワクチン接種がかなりの割合のワクチンレシピエントにおけるインフルエンザ関連疾病の予防に明らかに失敗していること、および(c) インフルエンザに対して承認された形態の治療薬（例えば、アダマンタン誘導体、およびより最近では、ノイラミニダーゼインヒビターであるオセルタミビル）に対して耐性になる頻度が高いことに基づく、インフルエンザAに対する新しい処置の形態を作り出すことが急務である。

20

【0013】

インフルエンザウイルスによって引き起こされる疾患の重症度を考慮すると、インフルエンザ感染を処置する新しい治療法が差し迫って必要とされている。ゆえに、有効な予防法または治療法がないということからして、インフルエンザウイルスに感染した宿主を処置するための治療用化合物および治療方法を提供することが、本発明の目的である。

30

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0014】

簡単な要旨

本発明の実施形態は、1つの態様において、一本鎖のマイナスセンスゲノムを有し、かつInfluenzavirus A属、Influenzavirus B属およびInfluenzavirus C属を含むOrthomyxoviridae科から選択されるRNAウイルスの宿主細胞内での複製を阻害する際に有効な抗ウイルス化合物を含む。その化合物は、以下から選択される領域内のウイルスRNA配列を標的にし得る：1) マイナスセンスウイルスRNAセグメントの5'または3'末端の25塩基；2) プラスセンスcRNAの5'または3'末端の末端の25塩基；3) インフルエンザウイルスのmRNAのAUG開始コドンの周辺の45塩基および；4) 選択的スプライシングに供されるインフルエンザmRNAのスプライス供与部位またはスプライス受容部位の周辺の50塩基。

40

【0015】

ある特定の実施形態において、抗ウイルス化合物は、a) スクレアーゼ抵抗性骨格、b) 12~40スクレオチド塩基、ならびにc) 以下：i) インフルエンザウイルスA、インフルエンザウイルスBおよびインフルエンザウイルスCのマイナスセンスウイルスRNAセグメント（例えば、M1またはM2を含むセグメント）の5'または3'末端の25塩基、ii) インフルエンザウイルスA、インフルエンザウイルスBおよびインフルエン

50

ザウイルスCのプラスセンスcRNAの5'または3'末端の末端の25塩基、iii) インフルエンザウイルスのmRNA (例えば、M1またはM2 mRNA) のAUG開始コドンの周辺の45塩基、ならびにiv) 選択的スプライシングに供されるインフルエンザウイルスA、インフルエンザウイルスBおよびインフルエンザウイルスCのmRNA (例えば、M1またはM2 mRNA) のスプライス供与部位またはスプライス受容部位の周辺の50塩基から選択される標的領域にハイブリダイズする少なくとも10塩基長の標的化配列を特徴とするオリゴヌクレオチドを含み得る。

【0016】

オリゴヌクレオチドはまた、a) 哺乳動物宿主細胞によって能動的に取り込まれる能力、および/またはb) ウイルス標的領域とヘテロ二重鎖構造を形成する能力を特徴とし得、ここで、前記ヘテロ二重鎖構造は：i) そのウイルスのプラスセンス鎖またはマイナスセンス鎖およびオリゴヌクレオチド化合物から構成され、そしてii) 少なくとも45℃の解離Tmを特徴とする。

10

【0017】

本発明の実施形態は、別の態様において、一本鎖で分節型のマイナスセンスゲノムを有し、かつOrthomyxoviridae科から選択される、感染しているインフルエンザウイルスの哺乳動物宿主細胞内での複製を阻害する抗ウイルス化合物を含む。その化合物は、上に記載されたエレメントを特徴とするオリゴヌクレオチドとして、感染した宿主細胞に投与され得る。その化合物は、インフルエンザウイルスに感染しているかまたはインフルエンザウイルスに感染するリスクのある哺乳動物被験体に投与され得る。

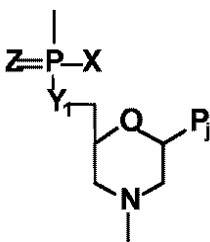
20

【0018】

本化合物は、1つのサブユニットのモルホリノ窒素を隣接サブユニットの5'環外炭素に結合する非荷電のリン含有サブユニット間結合によって連結されたモルホリノサブユニットから構成され得る。1つの実施形態において、サブユニット間結合は、以下の構造：

【0019】

【化1】



30

を有する結合などのホスホロジアミデート結合であり、ここで、 $Y_1 = O$ であり、 $Z = O$ であり、 P_j は、塩基特異的な水素結合によってポリヌクレオチド中の塩基に結合するのに有効なプリンもしくはピリミジンまたは等価な塩基対形成部分であり、そしてXは、アルキル、アルコキシ、チオアルコキシまたはアルキルアミノであり、例えば、 $X = NR_2$ である（各Rは独立して水素またはメチルである）。

【0020】

本化合物は、正に帯電した結合の間に散在する上に記載された非荷電結合で連結されたモルホリノサブユニットから構成され得る。正に帯電した結合の総数は、2と、結合の総数の半数以下との間である。その正に帯電した結合は、Xが1-ピペラジンである上記の構造を有する。

40

【0021】

本化合物は、上記ウイルスのプラスまたはマイナスセンスRNA鎖と上記のようなヘテロ二重鎖構造を形成することができるオリゴヌクレオチドアナログ部分と、宿主細胞内への本化合物の取り込みを増大するのに有効なアルギニンリッチポリペプチドとの共有結合性の結合体を含み得る。例示的なポリペプチドとしては、配列番号115～128として特定される配列のうちの1つが挙げられる。

【0022】

50

関連する態様において、本発明の実施形態は、以下：

- (a) マイナスセンスウイルスRNAの5'もしくは3'末端の25塩基および／または；
- (b) プラスセンスmRNAの5'もしくは3'末端の末端の25塩基および／または；
- (c) ウイルスmRNAのAUG開始コドンの周辺の45塩基および／または；
- (d) 選択的スプライシングに供されるインフルエンザmRNAのスプライス供与部位もしくはスプライス受容部位の周辺の50塩基と；
- (e)

(i) スクレアーゼ抵抗性骨格

(i i) 哺乳動物宿主細胞による取り込みが可能であること

(i i i) 12～40ヌクレオチド塩基を含むこと

を特徴とするオリゴヌクレオチド

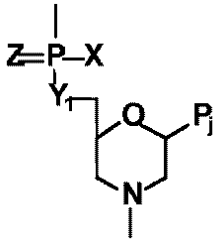
との間に形成されるヘテロ二重鎖複合体を含み、ここで、前記ヘテロ二重鎖複合体は、少なくとも45℃の解離T_mを有する。

【0023】

ある特定の実施形態において、例示的なオリゴヌクレオチドは、1つのサブユニットのモルホリノ窒素を隣接サブユニットの5'環外炭素に結合する非荷電のリン含有サブユニット間結合によって連結されたモルホリノサブユニットから構成され得る。その化合物は、以下の構造におけるようなホスホロジアミデート結合を有し得、

【0024】

【化2】



ここで、Y₁ = Oであり、Z = Oであり、P_jは、塩基特異的な水素結合によってポリヌクレオチド中の塩基に結合するのに有効なプリンまたはピリミジン塩基対形成部分であり、Xは、アルキル、アルコキシ、チオアルコキシまたはアルキルアミノである。好ましい化合物では、各Rが独立して水素またはメチルであるX = NR₂である。その化合物はまた、正に帯電した結合の間に散在する上に記載された非荷電結合で連結されたモルホリノサブユニットから構成され得る。正に帯電した結合の総数は、2と、結合の総数の半数以下との間である。その正に帯電した結合は、Xが1-ピペラジンである上記の構造を有する。

【0025】

本化合物は、オリゴヌクレオチド単独であってもよいし、オリゴヌクレオチドと、宿主細胞内への本化合物の取り込みを増大することができるアルギニンリッチポリペプチドとの結合体であってもよい。例示的なポリペプチドは、配列番号115～128として特定される配列のうちの1つを有する。

【0026】

なおも別の態様において、本発明の実施形態は、一本鎖で分節型のマイナスセンスRNAゲノムを有し、かつOrthomyxoviridae科から選択されるインフルエンザウイルスの哺乳動物宿主細胞内での複製を阻害する、アンチセンスオリゴヌクレオチドおよび関連方法を含む。その化合物は、本明細書中に記載されるウイルスRNAエレメントを特徴とし得る。ある特定の実施形態において、その細胞は、被験体内の細胞であり、代表的には、インフルエンザウイルス感染を有する被験体内の細胞である。

【0027】

いくつかの実施形態において、その被験体は、二次的細菌感染を有し、その方法は、細

10

20

30

40

50

菌用抗生物質を、その抗ウイルス性アンチセンスオリゴヌクレオチドと別個にまたはそれと同時に投与する工程をさらに包含する。特定の実施形態において、二次的細菌感染は、連鎖球菌性肺炎への感染（例えば、*Streptococcus pneumoniae*）である。ある特定の実施形態において、抗生物質は、ベータラクタムである。特定の実施形態において、抗生物質は、ペニシリン、アモキシシリン、セファロスポリン、クロラムフェニコールおよびクリンダマイシンから選択される。

【0028】

インフルエンザウイルスの複製を減少させる方法もまた含まれ、その方法は、CD200またはCD200レセプターをコードするRNA分子を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドを、本明細書中に記載される1つ以上の抗ウイルス性アンチセンスオリゴヌクレオチドと別個にまたはそれと同時に投与する工程を包含する。

10

【0029】

本明細書中に記載される抗ウイルス性アンチセンスオリゴヌクレオチドおよび薬学的に許容され得るキャリアを含む薬学的組成物。いくつかの実施形態において、その薬学的組成物は、細菌用抗生物質（例えば、ペニシリン、アモキシシリン、セファロスポリン、クロラムフェニコールまたはクリンダマイシン）をさらに含む。好ましい実施形態において、その細菌用抗生物質は、静菌性である。いくつかの実施形態において、その薬学的組成物は、CD200またはCD200レセプターをコードするRNA分子を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドをさらに含む。

20

【0030】

インフルエンザAウイルスなどのインフルエンザウイルスを処置するために、標的化配列は、配列番号1～11と特定される配列の群のうちの1つに関連する領域にハイブリダイズし得る。好ましい標的化配列は、配列番号4のマイナス鎖標的または配列番号2のプラス鎖標的のいずれかと相補的な標的化配列である。これらの2つの領域を標的にする例示的なアンチセンスホスホロジアミデートモルホリノオリゴマー（「PMO」）は、それぞれ配列番号23および12として列挙されている。

本発明は、例えば以下の項目を提供する。

（項目1）

単離された抗ウイルス性アンチセンスオリゴヌクレオチドであって、

a) ヌクレアーゼ抵抗性骨格；

b) 12～40ヌクレオチド塩基、ならびに

c) i) インフルエンザウイルスA、インフルエンザウイルスBおよびインフルエンザウイルスCのマイナスセンスウイルスRNAセグメントの5'または3'末端の25塩基

ii) インフルエンザウイルスA、インフルエンザウイルスBおよびインフルエンザウイルスCのプラスセンスcRNAの5'または3'末端の末端の30塩基

iii) インフルエンザウイルスのmRNAのAUG開始コドンの周辺の45塩基、および

iv) 選択的スプライシングに供されるインフルエンザmRNAのスプライス供与部位またはスプライス受容部位の周辺の50塩基

から選択される標的領域にハイブリダイズする少なくとも10塩基長の標的化配列を含む、単離された抗ウイルス性アンチセンスオリゴヌクレオチド。

40

（項目2）

前記オリゴヌクレオチドが、ウイルス標的領域とヘテロ二重鎖構造を形成する能力により特徴付けられ、ここで、前記ヘテロ二重鎖構造が：

a) 前記ウイルスのプラスセンス鎖またはマイナスセンス鎖および前記オリゴヌクレオチド化合物から構成され、そして

b) 少なくとも45℃の解離T_mにより特徴付けられる、項目1に記載のオリゴヌクレオチド。

（項目3）

前記オリゴヌクレオチドが、

50

i) インフルエンザウイルス A、インフルエンザウイルス B および インフルエンザウイルス C の M 1 または M 2 領域の マイナスセンス ウィルス RNA セグメントの 5' または 3' 末端の 25 塩基、

ii) インフルエンザウイルス A、インフルエンザウイルス B および インフルエンザウイルス C の M 1 または M 2 領域の プラスセンス cRNA の 5' または 3' 末端の 30 塩基

iii) インフルエンザの M 1 または M 2 mRNA の AUG 開始コドンの周辺の 45 塩基、および

iv) インフルエンザ M 1 または M 2 RNA の スプライス 供与 部位 または スプライス 受容 部位 の周辺の 50 塩基

10

から 選択 される 標的 領域 と 相補 的な 少なくとも 10 塩基 を 含む、項目 1 に 記載 の オリゴヌクレオチド。

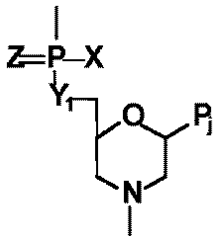
(項目 4)

前記 オリゴヌクレオチド が、1 つ の サブユニット の モルホリノ窒素 を 隣接 サブユニット の 5' 環外炭素 に 結合 する 非荷電 の リン (I I I) 含有 サブユニット 間 結合 によって 連結 された モルホリノ サブユニット を 含む、項目 1 に 記載 の オリゴヌクレオチド。

(項目 5)

前記 モルホリノ サブユニット が、以下の 構造：

【化 16】



20

に従う ホスホロジアミデート 結合 によって 結合 されており、

ここで、Y = O であり、Z = O であり、Pj は、塩基 特異 的な 水素 結合 によって ポリヌクレオチド 中の 塩基 に 結合 する のに 有効 な プリン または ピリミジン 塩基 対 形成 部分 であり、そして X は、アルキル、アルコキシ、チオアルコキシ または アルキル アミノ である、

30

項目 4 に 記載 の オリゴヌクレオチド。

(項目 6)

X = NR₂ であり、各 R は、独立 して 水素 または メチル であり、正に 帯電 した 結合 の 場合、X は、1-ピペラジン である、項目 5 に 記載 の オリゴヌクレオチド。

(項目 7)

少なくとも 2 つ かつ サブユニット 間 結合 の 総数 の 半数 以下 が、正に 帯電 している、項目 6 に 記載 の オリゴヌクレオチド。

(項目 8)

前記 モルホリノ オリゴマー が、配列 番号 13 に 示 される よう な 正に 帯電 した サブユニット 間 結合 を 含む、項目 6 に 記載 の オリゴヌクレオチド。

40

(項目 9)

前記 ウィルス 標的 領域 が、配列 番号 1 ~ 11 の うち の いずれ か 1 つ 以上 を 含む、項目 1 に 記載 の オリゴヌクレオチド。

(項目 10)

前記 ウィルス 標的 領域 が、配列 番号 2 または 4 を 含む、項目 1 に 記載 の オリゴヌクレオチド。

(項目 11)

前記 オリゴヌクレオチド が、配列 番号 12 ~ 47 の うち の いずれ か 1 つ 以上 の 少なくとも 10 個 連続 した 塩基 を 含む、項目 1 に 記載 の オリゴヌクレオチド。

(項目 12)

50

前記オリゴヌクレオチドが、配列番号 1 2 または 1 3 を含む、項目 1 に記載のオリゴヌクレオチド。

(項目 1 3)

前記オリゴヌクレオチドが、ペプチド核酸 (PNA) である、項目 1 に記載のオリゴヌクレオチド。

(項目 1 4)

配列番号 4 8 ～ 6 2 のうちのいずれか 1 つ以上の少なくとも 1 0 個連続した塩基を含む、項目 1 3 に記載の PNA オリゴヌクレオチド。

(項目 1 5)

配列番号 4 8 ～ 6 2 のうちの 1 つ以上から本質的になる、項目 1 4 に記載のオリゴヌクレオチド。

(項目 1 6)

1 つ以上のロック核酸 (LNA) サブユニットを含む、項目 1 に記載のオリゴヌクレオチド。

(項目 1 7)

LNA サブユニットから本質的になる、項目 1 6 に記載のオリゴヌクレオチド。

(項目 1 8)

配列番号 6 3 ～ 1 1 4 のうちのいずれか 1 つ以上の少なくとも 1 0 個連続した塩基を含む、項目 1 6 に記載のオリゴヌクレオチド。

(項目 1 9)

配列番号 6 3 ～ 1 1 4 のうちの 1 つ以上から本質的になる、項目 1 8 に記載のオリゴヌクレオチド。

(項目 2 0)

前記オリゴヌクレオチドが、宿主細胞内への前記化合物の取り込みを増大させるアルギニンリッチポリペプチドに結合体化されている、項目 1 に記載のオリゴヌクレオチド。

(項目 2 1)

前記アルギニンリッチポリペプチドが、配列番号 1 1 5 ～ 1 2 8 からなる群から選択される、項目 2 0 に記載のオリゴヌクレオチド。

(項目 2 2)

インフルエンザウイルスの複製を減少させる方法であって、前記方法は、インフルエンザウイルスに感染した細胞を、項目 1 ～ 2 1 のいずれか 1 項に記載の抗ウイルス性アンチセンスオリゴヌクレオチドと接触させる工程を包含する、方法。

(項目 2 3)

前記細胞が、被験体内の細胞であり、前記方法が、前記被験体に前記アンチセンスオリゴヌクレオチドを投与する工程を包含する、項目 2 2 に記載の方法。

(項目 2 4)

前記被験体が、二次的細菌感染を有し、細菌用抗生物質を、前記抗ウイルス性アンチセンスオリゴヌクレオチドと別個に、またはそれと同時に併用して投与する工程をさらに包含する、項目 2 3 に記載の方法。

(項目 2 5)

前記二次的細菌感染が、連鎖球菌性肺炎への感染である、項目 2 4 に記載の方法。

(項目 2 6)

前記抗生物質が、ベータラクタムである、項目 2 4 に記載の方法。

(項目 2 7)

前記抗生物質が、ペニシリン、アモキシシリン、セファロスポリン、クロラムフェニコールおよびクリンダマイシンから選択される、項目 2 4 に記載の方法。

(項目 2 8)

前記抗ウイルス性アンチセンスオリゴヌクレオチドと別個に、またはそれと同時に併用して、CD200 または CD200 レセプターをコードする RNA 分子を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドを投与する工程をさらに包含する、項目 2 3 または項目 2 4 に

10

20

30

40

50

記載の方法。

(項目 2 9)

項目 1 ～ 2 1 のいずれか 1 項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドおよび薬学的に許容され得るキャリアを含む、薬学的組成物。

(項目 3 0)

細菌用抗生物質をさらに含む、項目 2 9 に記載の薬学的組成物。

(項目 3 1)

C D 2 0 0 または C D 2 0 0 レセプターをコードする R N A 分子を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドをさらに含む、項目 2 9 に記載の薬学的組成物。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 3 1 】

【図 1 A】図 1 A は、ホスホロジアミデート結合を有する例示的なモルホリノオリゴマー構造を示している；

【図 1 B】図 1 B は、図 1 A におけるようなモルホリノオリゴマーであるが、その骨格結合が、1 つの正に帯電した基を（ピペラジノ）ホスホロジアミデート結合の形態で含む、モルホリノオリゴマーを示している；

【図 1 C】図 1 C は、アルギニンリッチペプチドと本発明の 1 つの実施形態におけるアンチセンスオリゴマーとの結合体を示している；

【図 1 D】図 1 D ～ G は、D から G と称される例示的なモルホリノオリゴヌクレオチドの反復サブユニットセグメントを示している。

【図 1 E】図 1 D ～ G は、D から G と称される例示的なモルホリノオリゴヌクレオチドの反復サブユニットセグメントを示している。

【図 1 F】図 1 D ～ G は、D から G と称される例示的なモルホリノオリゴヌクレオチドの反復サブユニットセグメントを示している。

【図 1 G】図 1 D ～ G は、D から G と称される例示的なモルホリノオリゴヌクレオチドの反復サブユニットセグメントを示している。

【図 2 - 1】図 2 は、P M O p l u s （商標）型（M 1 / M 2 - A U G p l u s ；配列番号 1 3）における本発明の好ましい例示的なアンチセンス化合物の構造を示している。3 つの（ピペラジノ）ホスホロジアミデート（p i p - P D A）結合が、正味の正電荷を付与するので、用語 P M O p l u s （商標）である。

【図 2 - 2】図 2 は、P M O p l u s （商標）型（M 1 / M 2 - A U G p l u s ；配列番号 1 3）における本発明の好ましい例示的なアンチセンス化合物の構造を示している。3 つの（ピペラジノ）ホスホロジアミデート（p i p - P D A）結合が、正味の正電荷を付与するので、用語 P M O p l u s （商標）である。

【図 3】図 3 は、感染した細胞に存在する異なる 3 種のインフルエンザウイルス RNA である v R N A、m R N A および v c R N A、ならびに本明細書中に記載される標的化 P M O の標的位置を示している。

【図 4】図 4 A は、重要な血清型のインフルエンザ：H 1 N 1、H 1 N 1（S - O I V）、H 5 N 1、H 3 N 2、H 9 N 2 および H 7 N 7 由来の M 1 / M 2 セグメントの 5' 末端の 6 0 ヌクレオチドの配列保存を示している。図 4 B は、記載の塩基を有する分離株のパーセンテージを、M 1 / M 2 - A U G 標的（配列番号 1 2）に対する各塩基の後の下付きの数字として示している。

【図 5 A】図 5 A ～ 5 B は、それぞれ A U G 開始コドンおよび v c R N A の 5' 末端に対する本発明の標的化配列の位置を示している。

【図 5 B】図 5 A ～ 5 B は、それぞれ A U G 開始コドンおよび v c R N A の 5' 末端に対する本発明の標的化配列の位置を示している。

【図 6】図 6 は、H 3 N 2 マウスモデル系において本発明の M 1 / M 2 - A U G 標的化合物（配列番号 1 2 および 1 3）を用いたときの、ウイルス力価の用量依存的減少を示している。

【図 7 A】図 7 A ～ 7 D は、M 1 / M 2 - A U G（配列番号 1 2 および 1 3）で処置され

10

20

30

40

50

たフェレットが、2009H1N1 (S-OIV) 汎発性ブタインフルエンザ単離株に感染した後に生存中にインフルエンザの臨床的徴候を減少させたことを示している。

【図7B】図7A～7Dは、M1/M2-AUG (配列番号12および13) で処置されたフェレットが、2009H1N1 (S-OIV) 汎発性ブタインフルエンザ単離株に感染した後に生存中にインフルエンザの臨床的徴候を減少させたことを示している。

【図7C】図7A～7Dは、M1/M2-AUG (配列番号12および13) で処置されたフェレットが、2009H1N1 (S-OIV) 汎発性ブタインフルエンザ単離株に感染した後に生存中にインフルエンザの臨床的徴候を減少させたことを示している。

【図7D】図7A～7Dは、M1/M2-AUG (配列番号12および13) で処置されたフェレットが、2009H1N1 (S-OIV) 汎発性ブタインフルエンザ単離株に感染した後に生存中にインフルエンザの臨床的徴候を減少させたことを示している。

【図7E】図7Eは、S-OIVに感染し、本発明のM1/M2-AUG化合物 (配列番号12および13) で処置されたたフェレットがウイルス力価の2.3 logの阻害をもたらしたことを示している。

【図8A】図8A～Cは、それぞれ、ウイルスのHA RNA、M1タンパク質およびM2タンパク質の発現に対する、スプライス受容部位を標的にするPPMOの作用を示している。

【図8B】図8A～Cは、それぞれ、ウイルスのHA RNA、M1タンパク質およびM2タンパク質の発現に対する、スプライス受容部位を標的にするPPMOの作用を示している。

【図8C】図8A～Cは、それぞれ、ウイルスのHA RNA、M1タンパク質およびM2タンパク質の発現に対する、スプライス受容部位を標的にするPPMOの作用を示している。

【図9A】図9A～Bは、ウイルスのHA RNAおよびM2タンパク質の発現に対する、M1/M2-AUG開始コドン を標的にするアンチセンスLNAオリゴマーの作用を示している。

【図9B】図9A～Bは、ウイルスのHA RNAおよびM2タンパク質の発現に対する、M1/M2-AUG開始コドン を標的にするアンチセンスLNAオリゴマーの作用を示している。

【図10A】図10A～Bは、ウイルスのHA RNAおよびM2タンパク質の発現に対する、M1/M2-AUG開始コドンおよびスプライス受容部位を標的にするアンチセンス2'OMeオリゴマーの作用を示している。

【図10B】図10A～Bは、ウイルスのHA RNAおよびM2タンパク質の発現に対する、M1/M2-AUG開始コドンおよびスプライス受容部位を標的にするアンチセンス2'OMeオリゴマーの作用を示している。

【図11】図11は、H1N1 PR8に感染し、M1/M2-AUG開始コドン を標的にするPPMOで処置されたMDC K細胞における、M1およびM2タンパク質の発現の阻害を示している。

【発明を実施するための形態】

【0032】

詳細な説明

定義

別段定義されない限り、本明細書中で使用されるすべての専門用語および科学用語は、本発明が属する分野の当業者が通常理解している意味と同じ意味を有する。本明細書中に記載される方法および材料と類似または等価な任意の方法および材料を本発明の実施または試行において使用することができるが、好ましい方法および材料が記載される。本発明のために、以下の用語が下で定義される。

【0033】

冠詞「a」および「an」は、1つまたは1つより多い (すなわち、少なくとも1つの)、その冠詞の文法上の対象のことを指すために本明細書中で使用される。例としては、

10

20

30

40

50

「エレメント (an element)」は、1つのエレメントまたは1つより多いエレメントのことを意味する。

【0034】

「約」は、基準の数量、レベル、値、数、頻度、パーセンテージ、寸法、サイズ、量、重量または長さに対して30、25、20、25、10、9、8、7、6、5、4、3、2または1%だけ異なる数量、レベル、値、数、頻度、パーセンテージ、寸法、サイズ、量、重量または長さのことを意味する。

【0035】

「コード配列」は、遺伝子のポリペプチド産物のコードに寄与する任意の核酸配列のことを意味する。対照的に、用語「非コード配列」とは、遺伝子のポリペプチド産物のコードに寄与しない任意の核酸配列のことを指す。

10

【0036】

本明細書全体を通して、文脈が別のことを求めない限り、単語「含む (comprise)」、「含む (comprises)」および「含む (comprising)」は、述べられている工程もしくはエレメントまたは工程もしくはエレメントの群を含むこと、他の任意の工程もしくはエレメントまたは工程もしくはエレメントの群を排除しないことを含意すると理解される。

【0037】

「～からなる」は、句「～からなる」の後に何が来ようともそれらを含み、かつそれらに限定されることを意味する。したがって、句「～からなる」は、列挙されるエレメントが、必要または必須であること、かつ他のエレメントが存在し得ないことを示す。「～から本質的になる」は、その句の後に列挙される任意のエレメントを含むこと、かつ列挙されるエレメントについて、本開示において特定される活性または作用を干渉しないかまたはそれらに参与しない他のエレメントに限定されることを意味する。したがって、句「～から本質的になる」は、列挙されるエレメントが、必要または必須であるが、他のエレメントが随意であり、列挙されるエレメントの活性または作用に大きく影響しないか否かに応じて、存在してもよいし、存在してはならないことを示す。

20

【0038】

用語「相補的」および「相補性」とは、塩基対形成の規則によって関係づけられるポリヌクレオチド（すなわち、ヌクレオチドの配列）のことを指す。例えば、配列「A-G-T」は、配列「T-C-A」と相補的である。相補性は、核酸の塩基の一部だけが塩基対形成の規則に従ってマッチしている「部分的」であり得る。または、核酸間には、「完全 (complete)」相補性または「全 (total)」相補性があり得る。核酸鎖間の相補性の程度は、核酸鎖間のハイブリダイゼーションの効率および強度に対して有意な影響を有する。完璧な相補性がしばしば望まれるが、いくつかの実施形態は、標的RNAに対して1つ以上であるが好ましくは6、5、4、3、2または1個のミスマッチを含み得る。オリゴマー内の任意の位置にバリエーションが含まれる。ある特定の実施形態において、オリゴマーの末端付近の配列内のバリエーションは、通常、内部のバリエーションよりも好ましく、存在する場合、代表的には、5'および/または3'末端の約6、5、4、3、2または1ヌクレオチド以内に存在する。

30

40

【0039】

用語「細胞透過性ペプチド」または「CPP」は、交換可能に使用され、輸送ペプチド、キャリアペプチドまたはペプチド導入ドメインとも呼ばれるカチオン性の細胞透過性ペプチドのことを指す。このペプチドは、本明細書中に示されるように、所与の細胞培養集団の30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%または100%（これらの間のすべての整数を含む）以内の細胞の細胞透過を誘導する能力を有し、全身投与された際に、インビボにおいて複数の組織内での高分子のトランスロケーションを可能にする。

【0040】

用語「アンチセンスオリゴマー」または「アンチセンス化合物」または「アンチセンス

50

オリゴヌクレオチド」または「オリゴヌクレオチド」は、交換可能に使用され、環式サブユニットの配列のことを指し、そのサブユニットの各々は、塩基対形成部分が、ワトソン-クリック塩基対形成によって核酸（代表的には、RNA）としての標的配列にハイブリダイズしてその標的配列内で核酸：オリゴマーヘテロ二重鎖を形成することを可能にする、サブユニット間結合によって連結された塩基対形成部分を有する。これらの環式サブユニットは、リボースもしくは別のペントース糖、またはある特定の形態では、モルホリノ基（下記のモルホリノオリゴマーの説明を参照のこと）に基づき得る。ペプチド核酸（PNA）、ロックト（locked）核酸（LNA）、2'-O-メチルオリゴヌクレオチドおよびRNA干渉物質（siRNA物質）ならびに当該分野で公知の他のアンチセンス物質もまた企図される。

10

【0041】

そのようなアンチセンスオリゴマーは、mRNAの翻訳を阻止するかもしれない阻害するように、または天然のプレmRNAのスプライシングプロセスを阻害するように、または標的にしているmRNAの分解を誘導するように、設計され得、それがハイブリダイズする標的配列「に向けられている」またはそれ「を標的にしている」と言われることがある。ある特定の形態において、標的配列は、mRNAのAUG開始コドン、プロセッシングを受ける前の（pre-processed）mRNAの3'または5'スプライス部位、ブランチポイントを含む領域を含む。標的配列は、エキソン内またはイントロン内に存在し得る。スプライス部位に対する標的配列は、プロセッシングを受ける前のmRNA内の通常のスプライスアクセプター分岐点から1〜約25塩基対下流の5'末端を有するmRNA配列を含み得る。好ましいスプライス部位標的配列は、スプライス部位を含むかまたは完全にエキソンコード配列内に含まれるかまたはスプライス受容部位もしくはスプライス供与部位にまたがる、プロセッシングを受ける前のmRNAの任意の領域である。オリゴマーは、上に記載された様式で標的の核酸を標的にするとき、より一般的には、生物学的に関連性のある標的（例えば、タンパク質、ウイルスまたは細菌）「を標的にしている」と言われる。

20

【0042】

配列番号12〜114のうちの1つ以上を含むか、それらから本質的になるか、またはそれらからなるアンチセンスオリゴヌクレオチドが含まれる。これらのアンチセンスオリゴマーのバリエーション（配列番号12〜114のいずれか1つに対して80%、85%、90%、95%、97%、98%または99%（これらの間のすべての整数を含む）の配列同一性または配列相同性を有するバリエーションオリゴマーを含む）、および／またはこれらの配列と約1、2、3、4、5、6、7、8、9または10ヌクレオチド異なるバリエーション、好ましくは、細胞内でのインフルエンザの複製を阻害するバリエーションもまた含まれる。本明細書中に記載されるように、適当な数の荷電結合（例えば、2〜5個の非荷電結合ごとに最大約1個（例えば、10個の非荷電結合ごとに約4〜5個））を含み、かつ／または本明細書中に記載されるように、それに付着されるArgリッチペプチドを含む、配列番号12〜114のうちのいずれか1つ以上のオリゴヌクレオチドもまた含まれる。

30

【0043】

用語「モルホリノオリゴマー」または「PMO」（ホスホリアミデートモルホリノオリゴマーまたはホスホロジアミデートモルホリノオリゴマー）とは、モルホリノサブユニット構造から構成されるオリゴヌクレオチドアナログのことを指し、ここで、（i）その構造は、1つのサブユニットのモルホリノ窒素を隣接サブユニットの5'環外炭素に結合する、好ましくは、非荷電またはカチオン性の、1〜3原子長、好ましくは、2原子長のリン含有結合によって共に連結されており、そして（ii）各モルホリノ環は、塩基特異的水素結合によってポリヌクレオチド中の塩基に結合するのに有効なプリンもしくはピリミジンまたは等価な塩基対形成部分を有する。例えば、好ましいホスホロジアミデート結合のタイプを示している図1Aの構造を参照のこと。結合または活性を干渉しない限り、この結合に対してバリエーションを生成することができる。例えば、リンに付着されている酸素は、硫黄で置換され得る（チオホスホロジアミデート）。5'酸素は、アミノまたは

40

50

低級アルキル置換アミノで置換され得る。リンに付着されているペンダント窒素は、非置換であり得るか、または（必要に応じて置換される）低級アルキルで一置換もしくは二置換され得る。下記のカチオン性結合の考察も参照のこと。そのプリンまたはピリミジン塩基対形成部分は、代表的には、アデニン、シトシン、グアニン、ウラシル、チミンまたはイノシンである。モルホリノオリゴマーの合成、構造および結合特性は、米国特許第5, 698, 685号、同第5, 217, 866号、同第5, 142, 047号、同第5, 034, 506号、同第5, 166, 315号、同第5, 521, 063号および同第5, 506, 337号、ならびにPCT出願番号PCT/US07/11435（カチオン性結合）およびPCT出願番号US2008/012804（改善された合成）（これらのすべてが、本明細書中で参考として援用される）に詳述されている。

10

【0044】

用語「オリゴヌクレオチドアナログ」とは、(i) 改変された骨格構造、例えば、天然のオリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチドに見られる標準的なホスホジエステル結合以外の骨格、ならびに(ii) 必要に応じて、改変された糖部分、例えば、リボース部分またはデオキシリボース部分ではなくモルホリノ部分を有するオリゴヌクレオチドのことを指す。オリゴヌクレオチドアナログは、ワトソン-クリック塩基対形成によって標準的なポリヌクレオチド塩基に水素結合することができる塩基を支持し、ここで、そのアナログ骨格は、そのオリゴヌクレオチドアナログ分子と、標準的なポリヌクレオチド（例えば、一本鎖RNAまたは一本鎖DNA）中の塩基との間のそのような水素結合を配列特異的な形式で可能にする様式で塩基を提示する。好ましいアナログは、実質的に非荷電のリン含有骨格を有するアナログである。

20

【0045】

オリゴヌクレオチドアナログ内の実質的に非荷電のリン含有骨格は、サブユニット結合の大部分、例えば、その結合の50～100%、代表的には、少なくとも60%～100%または75%または80%が、非荷電または実質的に非荷電であり、単一のリン(I I I)原子を含む骨格である。アンチセンスオリゴヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチドアナログは、約8～40個のサブユニット、代表的には、約8～25個のサブユニット、好ましくは、約12～25個のサブユニットを含み得る。ある特定の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、以下で定義されるように、標的配列に対して厳密な配列相補性またはよく似た相補性を有し得る。

30

【0046】

オリゴヌクレオチドの「サブユニット」とは、1つのヌクレオチド（またはヌクレオチドアナログ）単位のことを指す。この用語は、付着されたサブユニット間結合を有するかまたは有しないヌクレオチド単位のことを指し得るが、「荷電サブユニット」のことを指すとき、その電荷は、代表的には、サブユニット間結合（例えば、図1Bに示されるような、リン酸結合もしくはホスホロチオエート結合またはカチオン性結合）内に存在する。

【0047】

プリンまたはピリミジン塩基対形成部分は、代表的には、アデニン、シトシン、グアニン、ウラシル、チミンまたはイノシンである。塩基（例えば、ピリジン-4-オン、ピリジン-2-オン、フェニル、シュードウラシル、2, 4, 6-トリメチルキシベンゼン、3-メチルウラシル、ジヒドロウリジン、ナフチル、アミノフェニル、5-アルキルシチジン（例えば、5-メチルシチジン）、5-アルキルウリジン（例えば、リボチミジン）、5-ハロウリジン（例えば、5-ブロモウリジン）または6-アザピリミジンまたは6-アルキルピリミジン（例えば、6-メチルウリジン）、プロピン、キューオシン(queosine)、2-チオウリジン、4-チオウリジン、ワイプトシン、ワイプトキソシン、4-アセチルチジン(acetylthidine)、5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウリジン、5'-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウリジン、β-D-ガラクトシルキューオシン、1-メチルアデノシン、1-メチルイノシン、2, 2-ジメチルグアノシン、3-メチルシチジン、2-メチルアデノシン、2-メチルグアノシン、N6-メチルアデノシン、7-メチル

40

50

グアノシン、5-メトキシアミノメチル-2-チオウリジン、5-メチルアミノメチルウリジン、5-メチルカルボニルメチルウリジン (methyl carbonylmethyluridine)、5-メチルオキシウリジン、5-メチル-2-チオウリジン、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデノシン、 β -D-マンノシルキユーオシン、ウリジン-5-オキシ酢酸、2-チオシチジン、トレオニン誘導体など (Burginら、1996, Biochemistry, 35, 14090; Uhlman & Peyman, 前出) も含まれる。この態様における「改変された塩基」は、上で例証されたようなアデニン (A)、グアニン (G)、シトシン (C)、チミン (T) およびウラシル (U) 以外のヌクレオチド塩基のことを意味し；そのような塩基は、アンチセンス分子内の任意の位置において使用され得る。当業者は、オリゴマーの用途に応じて、TとUとが相互交換可能であることを認識するだろう。例えば、よりRNA様である2'-O-メチルアンチセンスオリゴヌクレオチドなどの他のアンチセンス化学を用いるとき、T塩基は、Uとして示され得る (例えば、配列表を参照のこと)。

10

【0048】

「アミノ酸サブユニット」または「アミノ酸残基」とは、 α -アミノ酸残基 ($-CO-CH(R)-NH-$) または β -もしくは他のアミノ酸残基 (例えば、 $-CO-(CH_2)_n-CH(R)-NH-$) (ここで、Rは、側鎖 (水素を含み得る) であり、nは、1~7、好ましくは、1~4である) のことを指し得る。

【0049】

用語「天然に存在するアミノ酸」とは、天然に見られるタンパク質中に存在するアミノ酸 (例えば、タンパク質生合成において利用される20種の(L)-アミノ酸)、ならびにその他のもの (例えば、4-ヒドロキシプロリン、ヒドロキシリジン、デスモシン、イソデスモシン、ホモシステイン、シトルリンおよびオルニチン) のことを指す。用語「非天然アミノ酸」とは、天然に見られるタンパク質中に存在しないアミノ酸のことを指し、例としては、ベーターアラニン (β -Ala)、6-アミノヘキサン酸 (Ahx) および6-アミノペンタン酸が挙げられる。「非天然アミノ酸」の追加の例としては、当業者に公知である、(D)-アミノ酸、ノルロイシン、ノルバリン、p-フルオロフェニルアラニン、エチオニンなどが挙げられるがこれらに限定されない。

20

【0050】

「単離された」とは、通常、自然の状態でそれを伴う成分を実質的または本質的に含まない材料のことを意味する。例えば、本明細書中で使用されるとき、「単離されたポリヌクレオチド」または「単離されたオリゴヌクレオチド」は、天然に存在する状態でそれに隣接する配列から精製されたかまたは取り出されたポリヌクレオチド、例えば、通常そのフラグメントに隣接する配列から取り出されたDNAフラグメントのことを指し得る。

30

【0051】

「有効量」または「治療有効量」とは、単一用量または一連の投薬の一部として哺乳動物被験体に投与される、所望の治療効果をもたらすのに有効な治療用化合物 (例えば、アンチセンスオリゴマーまたはRNA干渉物質 (例えば、siRNA)) の量のことを指す。アンチセンスオリゴマーの場合、この作用は、代表的には、選択された標的配列の翻訳または天然のスプライシングプロセスの阻害によってもたらされる。感染しているインフルエンザウイルスを標的にする「有効量」は、感染しているウイルスの複製の割合および/またはウイルス量および/またはそのウイルス感染に関連する症状を減少させるのに有効な量にも関する。

40

【0052】

「増大する (enhance)」もしくは「増大する (enhancing)」または「増加させる (increase)」もしくは「増加させる (increasing)」または「刺激する (stimulate)」もしくは「刺激する (stimulating)」とは、一般に、ある物あるいはアンチセンス化合物もしくはアンチセンス組成物またはRNAi化合物もしくはRNAi組成物が、細胞または被験体において、アンチセンス化合物なしまたはコントロール化合物によって引き起こされる応答と比べて、より大き

50

な生理反応（すなわち、下流の作用）をもたらすかまたは引き起こす能力のことを指す。「増加される」または「増大される」量は、代表的には、「統計学的に有意な」量であり、アンチセンス化合物なし（ある物質の非存在）またはコントロール化合物によってもたらされる量の1、1.1、1.2、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50倍またはそれ以上（例えば、500、1000倍）（これらの間の1より大きいすべての整数および小数点を含む）、例えば、1.5、1.6、1.7、1.8など）の増加を含み得る。

【0053】

用語「減少させる」または「阻害する」は、通常、本発明の1つ以上のアンチセンス化合物またはRNAi化合物が、診断の分野における通例の手法に従って測定される、関連性のある生理学的応答または細胞応答（例えば、本明細書中に記載される疾患または状態の症状）を「減少させる」能力に関し得る。関連性のある生理学的応答または細胞応答（インビボまたはインビトロ）は、当業者に明らかであり、インフルエンザ感染の症状もしくは病態の減少、またはウイルスの複製もしくはウイルス量の減少を含み得る。応答の「減少」は、アンチセンス化合物なしまたはコントロール組成物によってもたらされる応答と比べて「統計学的に有意」であり得、その減少としては、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%または100%の減少（その間のすべての整数を含む）が挙げられ得る。

【0054】

用語「標的配列」とは、オリゴヌクレオチドまたはアンチセンス物質が対象にしている標的RNAの一部、すなわち、そのオリゴヌクレオチドが相補的な配列のワトソン-クリック塩基対形成によってハイブリダイズし得る配列のことを指す。ある特定の実施形態において、その標的配列は、ウイルスのマイナス鎖RNAまたはウイルスのmRNAの連続している領域であってもよいし、ウイルスのゲノムRNAまたはウイルスの相補的RNAの5'および3'末端の配列の領域から構成されてもよい。

【0055】

用語「標的化配列」または「アンチセンス標的化配列」とは、RNAゲノム内の標的配列に相補的な（さらに、実質的に相補的を意味する）オリゴヌクレオチド内または他のアンチセンス物質内の配列のことを指す。アンチセンス化合物の配列全体または一部のみが、標的配列と相補的であり得る。例えば、20~30塩基を有するオリゴヌクレオチドにおいて、約6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28または29が、その標的領域と相補的な標的化配列であり得る。代表的には、標的化配列は、連続した塩基から形成されるが、その代わりに、一体となって（例えば、オリゴヌクレオチドの逆末端から）配置されると標的配列に及ぶ配列を構成する不連続な配列から形成されることがある。

【0056】

標的配列および標的化配列は、アンチセンス化合物の結合が、1) マイナスセンスウイルスRNAの5'もしくは3'末端の25塩基内；2) プラスセンスmRNAの5'もしくは3'末端の末端の30塩基内；3) ウイルスのmRNAのAUG開始コドンの周辺の45塩基内、および／または；4) 選択的スプライシングに供されるウイルスのmRNAのスプライス供与部位もしくはスプライス受容部位の周辺の50塩基内の領域に対する結合であるように選択され得る。ある特定の実施形態において、標的領域は、1) マイナスセンスウイルスRNAのM1もしくはM2領域の5'もしくは3'末端の25塩基；2) プラスセンスM1もしくはM2 mRNAの5'もしくは3'末端の末端の30塩基；3) M1もしくはM2 mRNAのAUG開始コドンの周辺の45塩基、および／または；4) M1もしくはM2 ウイルスのmRNAのスプライス供与部位もしくはスプライス受容部位の周辺の50塩基を含み得る。ある特定の実施形態において、標的領域は、AUGコドンと、ウイルスRNA（例えば、M1またはM2 mRNA）のスプライス供与部位の

周辺の塩基またはそれに関与する塩基（例えば、ポリピリミジントラクトまたはラリアット形成配列）との両方を含み得る。ある特定の実施形態において、M1/M2 RNAのAUG開始コドンと近位のスプライス供与配列（例えば、ポリピリミジントラクト）との両方を標的にする単一のアンチセンスオリゴマーまたはRNAi物質を用いることにより、標的タンパク質の発現の減少、ウイルスの複製の減少、またはその両方に関して相乗効果がもたらされ得る。

【0057】

標的配列および標的化配列は、逆平行の配置においてハイブリダイゼーションが生じる
とき、互いに「相補的」と記載される。標的化配列は、標的配列に対して「よく似た」相
補性または「実質的な」相補性を有し得、本発明のためになおも機能し得、すなわち、標
的配列は、なおも機能的に「相補的」であり得る。ある特定の実施形態において、オリゴ
ヌクレオチドは、標的配列と10ヌクレオチドのうち多くても1つのミスマッチを有し得
、好ましくは、20のうち多くても1つのミスマッチを有し得る。あるいは、オリゴヌク
レオチドは、本明細書中に記載される例示的なアンチセンス標的化配列と少なくとも90
%の配列相同性、好ましくは、少なくとも95%の配列相同性を有し得る。

【0058】

オリゴヌクレオチドが、生理学的条件下において標的にハイブリダイズする場合、その
オリゴマーは、標的ポリヌクレオチドに「特異的にハイブリダイズ」し、T_mは、45℃
より実質的に高く、好ましくは、少なくとも50℃より高く、代表的には、60℃～80
℃またはそれより高い。そのようなハイブリダイゼーションは、好ましくは、ストリンジ
ェントなハイブリダイゼーション条件に対応する。所与のイオン強度およびpHにおいて
、T_mは、標的配列の50%が相補的なポリヌクレオチドにハイブリダイズする温度であ
る。また、そのようなハイブリダイゼーションは、標的配列に対するそのアンチセンスオリ
ゴマーの「よく似た」相補性または「実質的な」相補性、ならびに正確な相補性で生じ
得る。

【0059】

「相同性」とは、同一であるアミノ酸または保存的置換を構成するアミノ酸のパーセン
テージの数値のことを指す。相同性は、GAP (Deverauxら、1984, Nucleic Acids Research 12, 387-395) などの配列比較プロ
グラムを用いて決定され得る。このように、本明細書中で引用される配列と類似の長さま
たは実質的に異なる長さの配列は、アラインメントにギャップを挿入することによって比
較され得、そのようなギャップは、例えば、GAPが使用する比較アルゴリズムによって
決定される。

【0060】

「配列同一性」という詳述または例えば「～と50%同一の配列」を含む詳述は、本明
細書中で使用されるとき、配列が、比較範囲にわたって、ヌクレオチドごとに基づいてま
たはアミノ酸ごとに基づいて同一である程度のことを指す。したがって、「配列同一性の
パーセンテージ」は、2つの最適にアラインメントされた配列を、比較の範囲にわたって
比較し、同一の核酸塩基（例えば、A、T、C、G、I）または同一のアミノ酸残基（例
えば、Ala、Pro、Ser、Thr、Gly、Val、Leu、Ile、Phe、Tyr、Trp、Lys、Arg、His、Asp、Glu、Asn、Gln、Cysおよ
びMet）が両方の配列に存在する位置の数を測定することによりマッチした位置の数を
得て、マッチした位置の数を比較の範囲内の位置の総数（すなわち、範囲サイズ）で除し
、その結果に100を乗じることにより配列同一性のパーセンテージを得ることによって
、算出され得る。

【0061】

2つ以上のポリヌクレオチド間または2つ以上のポリペプチド間の配列の関係性を記載
するために使用される用語としては、「参照配列」、「比較範囲」、「配列同一性」、「
配列同一性のパーセンテージ」および「実質的な同一性」が挙げられる。「参照配列」は
、ヌクレオチドおよびアミノ酸残基を含めて、少なくとも8または10モノマー単位の長

さであるが、頻繁に15～18モノマー単位、しばしば少なくとも25モノマー単位の長さである。2つのポリヌクレオチドは各々、(1)その2つのポリヌクレオチド間で類似の配列(すなわち、完全なポリヌクレオチド配列の一部のみ)および(2)その2つのポリヌクレオチド間で互いに異なる配列を含み得るので、2つ(またはそれ以上)のポリヌクレオチド間の配列の比較は、代表的には、配列が似ている局所領域を同定して比較するためにその2つのポリヌクレオチドの配列を「比較範囲」にわたって比較することによって行われる。「比較範囲」とは、2つの配列(ある配列および参照配列)を最適にアラインメントした後に、そのある配列が、参照配列の同じ数だけ連続した位置と比較される、少なくとも6つ連続した(通常、約50～約100、より通常では約100～約150の)位置の概念的なセグメントのことを指す。その比較範囲は、2つの配列を最適にアラインメントするために、参照配列(付加または欠失を含まない)と比べて、約20%以下の付加または欠失(すなわち、ギャップ)を含み得る。比較範囲をアラインメントするための配列の最適なアラインメントは、アルゴリズム(Wisconsin Genetic Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison, WI, USAにおけるGAP、BESTFIT、FASTAおよびTFASTA)のコンピュータ化された実行、または検査、および選択される様々な方法のいずれかによって生成される最善のアラインメント(すなわち、比較範囲に対して最も高い相同性パーセンテージがもたらされるアラインメント)によって行われ得る。例えば、Altschulら、1997, Nucl. Acids Res. 25:3389によって開示されているようなBLASTファミリーのプログラムに対しても参照が行われ得る。配列解析に関する詳細な考察は、Ausubelら、“Current Protocols in Molecular Biology”, John Wiley & Sons Inc, 1994-1998, Chapter 15のUnit 19.3に見られ得る。

【0062】

「ヌクレアーゼ抵抗性」オリゴマー分子(オリゴマー)とは、その骨格が、ハイブリダイズされていない形態またはハイブリダイズされた形態で、身体内の通常の細胞外および細胞内のヌクレアーゼによるヌクレアーゼ切断に対して実質的に抵抗性であるオリゴマー分子のことを指し、すなわち、そのオリゴマーは、オリゴマーが曝される身体内の通常のヌクレアーゼ条件下において、ほとんどまたはまったくヌクレアーゼ切断を示さない。

【0063】

「ヘテロ二重鎖」とは、アンチセンスオリゴヌクレオチドと、標的RNAの相補的な一部との間の二重鎖のことを指す。「ヌクレアーゼ抵抗性ヘテロ二重鎖」とは、相補的な標的に対するアンチセンスオリゴマーの結合によって形成されるヘテロ二重鎖のことを指し、そのヘテロ二重鎖は、細胞内および細胞外のヌクレアーゼ(例えば、二本鎖RNA/RNAまたはRNA/DNA複合体を切断することができるRNase H)によるインビボでの分解に対して実質的に抵抗性である。

【0064】

「標的RNAに関わる塩基特異的な細胞内結合事象」とは、細胞内部における標的RNA配列へのアンチセンスオリゴヌクレオチドの特異的な結合のことを指す。そのような結合に関する塩基の特異性は、配列依存的である。例えば、一本鎖ポリヌクレオチドは、配列内の相補的な一本鎖ポリヌクレオチドに特異的に結合し得る。

【0065】

本明細書中で使用されるとき、用語「体液」は、尿、唾液、血漿、血液、髄液を含む被験体から得られる種々のサンプルタイプ、または生物学的起源の他のサンプル(例えば、皮膚細胞または皮膚の残骸)を包含し、それらに懸濁された細胞もしくは細胞フラグメント、または液体の媒質およびその溶質のことを指し得る。

【0066】

用語「相対量」は、試験測定値とコントロール測定値とが比較される場合に使用される。ある反応において複合体を形成する反応物の相対量は、コントロール検体と反応する量

10

20

30

40

50

と比べたときの、試験検体と反応する量である。コントロール検体は、同じアッセイにおいて別個に扱われてもよいし、同じサンプルの一部（例えば、組織切片内の悪性領域の周辺の正常組織）であってもよい。

【0067】

個体または細胞の「処置」は、個体または細胞における疾患または病態の自然経過を変化させる手段として提供される任意のタイプの介入である。処置としては、例えば、薬学的組成物の投与が挙げられるがこれに限定されず、処置は、予防的に、または病的な事象が開始した後もしくは病因物質と接触した後に、行われ得る。処置は、インフルエンザウイルス感染に関連する疾患または状態の症状または病態に対する任意の望ましい作用を含む。特定のウイルスに感染したと診断された患者と比べて「改善された治療成績」という関連する用語は、ウイルスの増殖またはウイルス量またはその特定のウイルスによる感染に関連する検出可能な症状の遅延または減少のことを指し得る。

10

【0068】

処置される疾患または状態の進行速度を減少させること、その疾患もしくは状態の発生を遅延させること、またはその発生の深刻度を減少させることに向けられ得る「予防的な」処置も含まれる。「処置」または「予防」は、必ずしも、その疾患もしくは状態またはその関連症状の完全な根絶、治癒または防止を示すわけではない。

【0069】

ある物質が、細胞膜を越えた受動拡散以外の機構によって細胞に侵入することができるとき、その物質は、「哺乳動物の細胞によって能動的に取り込まれる」。その物質は、例えば、「能動輸送」（例えばATP依存的な輸送機構による、哺乳動物の細胞膜を越えた物質の輸送のことを指す）、または「促進輸送」（結合したアンチセンス物質が膜を越えて通過するのを促進する輸送タンパク質にアンチセンス物質が結合していることを必要とする輸送機構による、細胞膜を越えたアンチセンス物質の輸送のことを指す）によって、運搬され得る。能動輸送と促進輸送の両方のために、オリゴヌクレオチドアナログは、好ましくは、下記に定義されるような実質的に非荷電の骨格を有する。

20

【0070】

あるいは、アンチセンス化合物は、複合体化された形態で（例えば、エンドサイトーシス機構によって細胞内に取り込まれ得る、カチオン性の脂質またはリポソームと複合体化されたアニオン性骨格を有する物質として）製剤化され得る。アンチセンスオリゴヌクレオチドはまた、例えば、その5'または3'末端において、アルギニンリッチペプチド（例えば、HIV TATタンパク質の一部）、ポリアルギニン、またはアルギニンと他のアミノ酸（非天然アミノ酸である6-アミノヘキサ酸（Ahx）およびベーターアラニン（βAla）を含む）との組み合わせに結合体化され得る。例示的なアルギニンリッチ送達ペプチドは、配列番号115～128として列挙される。これらの例示的なアルギニンリッチ送達ペプチドは、記載されているように（Moulton, Nelsonら、2004）標的宿主細胞内への輸送を促進する。

30

【0071】

ゆえに、本発明の1つ以上のアンチセンスオリゴマー（例えば、配列番号12～114およびそれらのバリエーション）を、必要に応じて薬学的製剤または薬学的剤形の一部として、インフルエンザウイルス感染を処置する必要がある被験体に投与することによる、インフルエンザウイルス感染を処置する方法が含まれる。「被験体」は、本明細書中で使用されるとき、本発明のアンチセンス化合物で処置され得る症状を示すかまたはその症状を示すリスクのある任意の動物（例えば、インフルエンザウイルスに感染しているかまたは感染するリスクのある被験体）を含み得る。適当な被験体（患者）としては、実験動物（例えば、マウス、ラット、ウサギまたはモルモット）、家畜および飼育されている動物またはペット（例えば、ネコまたはイヌ）が挙げられる。非ヒト霊長類、および好ましくは、ヒト患者が含まれる。

40

【0072】

RNA干渉（RNAi）（例えば、二本鎖RNA分子すなわちdsRNAが関わるもの

50

）の別の方法もまた企図される。用語「二本鎖」とは、それらの鎖の少なくとも一部が、水素結合と十分に相補的であり、二重鎖構造を形成する領域を含む、2本の別個の核酸鎖のことを意味する。用語「二重鎖」または「二重鎖構造」とは、2本の別個の鎖が、実質的に相補的であるがゆえに互いにハイブリダイズする、二本鎖分子の領域のことを指す。

【0073】

「dsRNA」とは、2本の相補的かつ逆平行の核酸鎖（すなわち、センス鎖およびアンチセンス鎖）を含む二重鎖構造を有するリボ核酸分子のことを指す。dsRNAのすべてのヌクレオチドが、ワトソン-クリック塩基対を示さなければならないわけではない；それらの2本のRNA鎖は、実質的に相補的であり得る。それらのRNA鎖は、同じ数または異なる数のヌクレオチドを有し得る。用語「dsRNA」には、「siRNA」または低分子干渉RNAも含まれる。

10

【0074】

用語「リボヌクレオチド」または「ヌクレオチド」は、改変されたRNAまたはヌクレオチド代理物の場合、1つ以上の位置における、改変されたヌクレオチドまたは代理物置換部分のことも指し得ることが理解されるだろう。したがって、dsRNAは、標的RNAと少なくとも部分的に相補的な領域であるかまたはそのような領域を含む。ある特定の実施形態において、dsRNAは、標的RNAと完全に相補的である。dsRNAと標的との間に完璧な相補性が存在することは不可欠ではないが、その対応は、dsRNAまたはその切断産物が配列特異的なサイレンシング（例えば、標的RNAのRNAi切断によるサイレンシング）を指示するのに十分でなければならない。標的鎖との相補性、すなわち相同性の程度は、アンチセンス鎖において最も重大である。特にアンチセンス鎖において完璧な相補性が望まれることが多いが、いくつかの実施形態は、標的RNAに対して1つ以上であるが、好ましくは、6、5、4、3、2個またはそれより少ないミスマッチを含み得る。それらのミスマッチは、末端の領域において最も許容され、存在する場合、好ましくは、末端の領域、例えば、5'および/または3'末端の6、5、4または3ヌクレオチド以内に存在する。センス鎖は、その分子の全体的な二本鎖の特性を維持するためにアンチセンス鎖と実質的に相補的であることだけが必要である。

20

【0075】

本明細書中で使用されるとき、「改変されたdsRNA」とは、それを、同じ標的RNAを認識する同一のdsRNA分子よりもヌクレアーゼ（例えば、タンパク質キナーゼ）に対して抵抗性にする少なくとも1つの変更を含むdsRNA分子のことを指す。改変されたdsRNAは、一本鎖ヌクレオチドオーバーハングおよび/または少なくとも1つの置換ヌクレオチドを含み得る。

30

【0076】

本明細書中で使用されるとき、「ヌクレオチドオーバーハング」とは、一方のRNA鎖の3'末端が他方の相補鎖の5'末端を超えて伸長しているときまたはその逆のとき二重鎖構造から突出している、対になっていないヌクレオチドのことを指す。「ブラント」または「平滑末端」とは、対になっていないヌクレオチドがdsRNAの末端に存在しないこと、すなわち、ヌクレオチドオーバーハングが存在しないことを意味する。「平滑末端化された」dsRNAは、その長さ全体にわたって二本鎖である、すなわち、その分子の両端においてヌクレオチドオーバーハングがない、dsRNAである。

40

【0077】

用語「末端の塩基対」とは、本明細書中で使用されるとき、二本鎖分子の二重鎖領域の一方の末端における最後のヌクレオチド塩基対のことを指す。例えば、dsRNAまたは他の分子が、平滑末端化されている場合（すなわち、ヌクレオチドオーバーハングを有しない場合）、その分子の両端における最後のヌクレオチド塩基対が、末端の塩基対である。dsRNAまたは他の分子が、二重鎖構造の片端または両端にヌクレオチドオーバーハングを有する場合、そのヌクレオチドオーバーハングのすぐ隣りの最後のヌクレオチド塩基対が、その分子のその末端における末端の塩基対である。

【0078】

50

本発明のオリゴマーのインフルエンザウイルス標的化配列を発現することができるベクター送達系（例えば、本明細書中に記載されるような配列番号12～114のうちのいずれか1つ以上もしくはそれらのバリエーションを含むポリヌクレオチド配列を発現するベクター、または配列番号1～11の標的配列のうちのいずれかまたはそれ以上と相補的なポリヌクレオチド配列を発現するベクター）もまた含まれる。siRNAまたは他の二重鎖形成RNA干渉分子を発現するベクターが含まれる。

【0079】

「ベクター」または「核酸構築物」は、ポリヌクレオチド分子、好ましくは、例えば、ポリヌクレオチドが挿入され得るかまたはクローニングされ得る、プラスミド、バクテリオファージ、酵母またはウイルスに由来するDNA分子のことを意味する。ベクターは、好ましくは、1種以上の唯一の制限酵素認識部位を含み、定義された宿主細胞（標的細胞もしくは標的組織またはその前駆細胞もしくは前駆組織を含む）内での自律複製が可能であり得るか、またはクローニングされた配列が複製可能であるように、定義された宿主のゲノムとインテグレート可能であり得る。したがって、ベクターは、自己複製ベクター、すなわち、染色体外の実体として存在するベクター（その複製は、染色体の複製から独立している）、例えば、直鎖状もしくは閉環状のプラスミド、染色体外エレメント、ミニ染色体または人工染色体であり得る。そのベクターは、自己複製を保証するための任意の手段を含み得る。あるいは、そのベクターは、それが宿主細胞内に導入されたときに、そのゲノムにインテグレートされて、それがインテグレートされた染色体と共に複製されるベクターであり得る。

【0080】

ベクター系または核酸構築物系は、単一のベクターまたはプラスミド、2つ以上のベクターまたはプラスミドを含み得、それらは共に、宿主細胞のゲノム内に導入される全DNAまたはトランスポゾンを含む。ベクターの選択は、代表的には、ベクターが導入される宿主細胞とそのベクターとの適合性に依存し得る。本発明の場合、そのベクターまたは核酸構築物は、好ましくは、筋細胞などの哺乳動物細胞内において作動可能に機能的であるものである。そのベクターは、適当な形質転換体またはトランスフェクタントの選択または同定のために使用され得る、選択マーカー（例えば、抗生物質耐性遺伝子または薬物耐性遺伝子）またはレポーター遺伝子（すなわち、緑色蛍光タンパク質、ルシフェラーゼ）も含み得る。例示的な送達系としては、ウイルスのベクター系（すなわち、ウイルス媒介性の形質導入）（当該分野で公知の他のもののうち、レトロウイルス（例えば、レンチウイルス）ベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターおよびヘルペスウイルスベクターが挙げられるがこれらに限定されない）が挙げられ得る。

【0081】

本明細書中で使用されるとき、用語「作動可能に連結された」は、オリゴマーをコードする配列を、そのオリゴマーの転写を制御するプロモーターの調節管理下に置くことを意味する。

【0082】

野生型の遺伝子または遺伝子産物は、ある集団において最も頻繁に観察される遺伝子または遺伝子産物であり、ゆえに、その遺伝子の「正常型」または「野生型」と任意に称される（designed）。

【0083】

「アルキル」とは、分枝状、直鎖状または環状（シクロアルキル）であり得る、炭素および水素を含む完全に飽和した一価ラジカルのことを指す。アルキル基の例は、メチル、エチル、n-ブチル、t-ブチル、n-ヘプチル、イソプロピル、シクロプロピル、シクロペンチル、エチルシクロペンチルおよびシクロヘキシルである。一般に、「低級アルキル」と呼ばれる1～6個の炭素原子を有するアルキル基が好ましく、それらは、メチル、エチル、n-ブチル、i-ブチル、t-ブチル、イソアミル、n-ペンチルおよびイソペンチルによって例証される。1つの実施形態において、低級アルキルとは、C₁～C₄アルキルのことを指す。

【0084】

「アルケニル」とは、分枝状、直鎖状または環状であり得る、炭素および水素を含む不飽和の一価ラジカルのことを指す。アルケニル基は、一不飽和または多価不飽和であり得る。一般に、「低級アルケニル」と呼ばれる1～6個の炭素原子を有するアルケニル基が好ましい。

【0085】

「アルキニル」とは、少なくとも1つの炭素-炭素三重結合を含む、2～18個の炭素を含む不飽和の直鎖または分枝鎖の炭化水素ラジカルのことを指す。例としては、エチニル、プロピニル、イソプロピニル、ブチニル、イソブチニル、tert-ブチニル、ペンチニルおよびヘキシニルが挙げられるが、これらに限定されない。用語「低級アルキニル」とは、2～8個の炭素を含む、本明細書中で定義されるようなアルキニル基のことを指す。

10

【0086】

「シクロアルキル」とは、単環式または多環式のアルキルラジカルのことを指す。例としては、シクロブチル、シクロペンチル(cycopentyl)、シクロヘキシル、シクロヘプチルおよびシクロオクチルが挙げられるが、これらに限定されない。

【0087】

「アリール」とは、通常1つの環（例えば、フェニル）または2つの縮合環（例えば、ナフチル）を有する、置換されたまたは非置換の一価芳香族ラジカルのことを指す。この用語には、環内に1つ以上の窒素、酸素または硫黄原子を有する芳香族環基であるヘテロアリール基（例えば、フリル、ピロリル、ピリジルおよびインドリル）が含まれる。「置換された」は、アリール基内の1つ以上の環水素が、ハロゲン化物（例えば、フッ素、塩素または臭素）；1つもしくは2つの炭素原子を含む低級アルキル基；ニトロ、アミノ、メチルアミノ、ジメチルアミノ、メトキシ、ハロメトキシ、ハロメチルまたはハロエチルで置き換えられていることを意味する。好ましい置換基としては、ハロゲン、メチル、エチルおよびメトキシが挙げられる。1つの環を有するアリール基が一般に好ましい。

20

【0088】

「アラルキル」とは、アリール基でさらに置換されたアルキル、好ましくは、低級(C_1-C_4 、より好ましくは、 C_1-C_2)アルキル置換基のことを指し；例は、ベンジル($-CH_2C_6H_5$)およびフェネチル($-CH_2CH_2C_6H_5$)である。

30

【0089】

「チオアルコキシ」とは、式-SR_cのラジカルのことを指し、ここで、R_cは、本明細書中で定義されるようなアルキルラジカルである。用語「低級チオアルコキシ」とは、1～8個の炭素を含む、本明細書中で定義されるようなアルコキシ基のことを指す。

【0090】

「アルコキシ」とは、式-OR_dのラジカルのことを指し、ここで、R_dは、本明細書中で定義されるようなアルキルラジカルである。用語「低級アルコキシ」とは、1～8個の炭素を含む、本明細書中で定義されるようなアルコキシ基のことを指す。アルコキシ基の例としては、メトキシおよびエトキシが挙げられるがこれらに限定されない。

40

【0091】

「アルコシアルキル」とは、アルコキシ基で置換されたアルキル基のことを指す。

【0092】

「カルボニル」とは、 $-C(=O)-$ ラジカルのことを指す。

【0093】

「グアニジニル」とは、 $H_2N(C=NH_2)-NH-$ ラジカルのことを指す。

【0094】

「アミジニル」とは、 $H_2N(C=NH_2)CH-$ ラジカルのことを指す。

【0095】

「アミノ」とは、 $-NH_2$ ラジカルのことを指す。

【0096】

50

「アルキルアミノ」とは、式 —NHR_d または $\text{—NR}_d\text{R}_d$ のラジカルのことを指し、ここで、各 R_d は、独立して、本明細書中で定義されるようなアルキルラジカルである。用語「低級アルキルアミノ」とは、1～8個の炭素を含む、本明細書中で定義されるようなアルキルアミノ基のことを指す。

【0097】

「複素環」は、飽和、不飽和または芳香族であり、窒素、酸素および硫黄から独立して選択される1～4個のヘテロ原子を含む、5～7員の単環式または7～10員の二環式の複素環式環のことを意味し、ここで、その窒素および硫黄ヘテロ原子は、必要に応じて酸化され得、窒素ヘテロ原子は、必要に応じて四級化され得、この複素環には、上記複素環のいずれかがベンゼン環に縮合された二環式環が含まれる。複素環は、任意のヘテロ原子または炭素原子を介して付着され得る。好ましくは、環原子は、3～6個の炭素原子を含む。そのような複素環としては、例えば、ピロリジン、ピペリジン、ピペラジンおよびモルホリンが挙げられる。

10

【0098】

複素環には、下で定義されるようなヘテロアリールが含まれる。したがって、下に列挙されるヘテロアリールに加えて、複素環には、モルホリニル、ピロリジニル、ピロリジニル、ピペリジニル、ピペリジニル、ヒダントイニル、バレロラクタミル、オキシラニル、オキセタニル、テトラヒドロフラニル、テトラヒドロピラニル、テトラヒドロピリジニル、テトラヒドロチオフェニル、テトラヒドロチオピラニル、テトラヒドロピリミジニル、テトラヒドロチオピラニルなども含まれる。

20

【0099】

「ヘテロアリール」は、窒素、酸素および硫黄から選択される少なくとも1つのヘテロ原子を有し、かつ少なくとも1つの炭素原子を含む、5～10員の芳香族複素環のことを意味し、このヘテロアリールは、単環式の環系と二環式の環系の両方を含む。代表的なヘテロアリールは、ピリジル、フリル、ベンゾフラニル、チオフェニル、ベンゾチオフェニル、キノリニル、ピロリル、インドリル、オキサゾリル、ベンゾオキサゾリル、イミダゾリル、ベンズイミダゾリル、チアゾリル、ベンゾチアゾリル、イソオキサゾリル、ピラゾリル、イソチアゾリル、ピリダジニル、ピリミジニル、ピラジニル、トリアジニル、シンノリニル、フタラジニルおよびキナゾリニルである。

【0100】

30

アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、アラルキルまたはアルカリール (alkaryl) 基に関する用語「置換された」とは、ヘテロ原子含有置換基 (例えば、ハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、チオール、アルキルチオ、アミノ、アルキルアミノ、イミノ、オキソ (ケト)、ニトロ、シアノ) または様々な酸もしくはエステル (例えば、カルボン酸、スルホン酸またはホスホン酸) による水素原子の置き換えのことを指す。

【0101】

特にアルキル、アルコキシ、チオアルコキシまたはアルキルアミノ基に関する用語「置換された」とは、ヘテロ原子含有置換基 (例えば、ハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、チオール、アルキルチオ、アミノ、アルキルアミノ、イミノ、オキソ (ケト)、ニトロ、シアノ) または様々な酸もしくはエステル (例えば、カルボン酸、スルホン酸またはホスホン酸) による炭素上の水素原子の置き換えのことを指す。置換とは、アルキル、カルボニルまたは他の炭素含有基によるヘテロ原子 (例えば、アミン水素) 上の水素原子の置き換えのことも指し得る。

40

【0102】

ある特定の実施形態において、用語「必要に応じて置換されるアルキル」、「必要に応じて置換されるアルケニル」、「必要に応じて置換されるアルコキシ」、「必要に応じて置換されるチオアルコキシ」、「必要に応じて置換されるアルキルアミノ」、「必要に応じて置換される低級アルキル」、「必要に応じて置換される低級アルケニル」、「必要に応じて置換される低級アルコキシ」、「必要に応じて置換される低級チオアルコキシ」、「必要に応じて置換される低級アルキルアミノ」および「必要に応じて置換されるヘテロ

50

シクリル」は、置換されるとき、少なくとも1つの水素原子が置換基で置き換えられることを意味する。オキソ置換基(=O)の場合、2つの水素原子が置き換えられる。その際、置換基には：ジュウテリウム、必要に応じて置換されるアルキル、必要に応じて置換されるアルケニル、必要に応じて置換されるアルキニル、必要に応じて置換されるアリール、必要に応じて置換される複素環、必要に応じて置換されるシクロアルキル、オキソ、ハロゲン、 $-CN$ 、 $-OR_x$ 、 NR_xR_y 、 $NR_xC(=O)R_y$ 、 $NR_xSO_2R_y$ 、 $-NR_xC(=O)NR_xR_y$ 、 $C(=O)R_x$ 、 $C(=O)OR_x$ 、 $C(=O)NR_xR_y$ 、 $-S OmR_x$ および $-S OmNR_xR_y$ が含まれ、ここで、 m は、0、1または2であり、 R_x および R_y は、同じかまたは異なり、それらは独立して、水素、必要に応じて置換されるアルキル、必要に応じて置換されるアルケニル、必要に応じて置換されるアルキニル、必要に応じて置換されるアリール、必要に応じて置換される複素環または必要に応じて置換されるシクロアルキルであり、前記必要に応じて置換されるアルキル、必要に応じて置換されるアルケニル、必要に応じて置換されるアルキニル、必要に応じて置換されるアリール、必要に応じて置換される複素環および必要に応じて置換されるシクロアルキル置換基の各々は、オキソ、ハロゲン、 $-CN$ 、 $-OR_x$ 、 NR_xR_y 、 $NR_xC(=O)R_y$ 、 $NR_xSO_2R_y$ 、 $-NR_xC(=O)NR_xR_y$ 、 $C(=O)R_x$ 、 $C(=O)OR_x$ 、 $C(=O)NR_xR_y$ 、 $-S OmR_x$ および $-S OmNR_xR_y$ のうちの1つ以上でさらに置換され得る。

10

【0103】

インフルエンザウイルスゲノムの複製を阻害することができる標的化配列の選択は、以下で論じられる。

20

【0104】

標的にされるウイルス

本発明の実施形態は、(i) 1) マイナスセンスウイルスRNAの5'もしくは3'末端の25塩基；2) プラスセンスmRNAの5'もしくは3'末端の末端の30塩基；3) ウイルスマRNAのAUG開始コドンの周辺の45塩基、および／または；4) 選択的スプライシングに供されるインフルエンザmRNAのスプライス供与部位もしくはスプライス受容部位の周辺の50塩基を標的にする、アンチセンスオリゴヌクレオチド化合物、ならびに(ii) 宿主細胞内でのアンチセンス化合物とウイルスとの有効な相互作用を可能にする物理的特徴および薬物動態学的特徴を有するアンチセンスオリゴヌクレオチド化合物に、インフルエンザウイルスに感染した動物を曝露することによって、一本鎖で分節型のマイナスセンスRNAウイルスの有効な阻害が達成され得るという発見に部分的に基づく。ある特定の実施形態において、そのオリゴマーは、インフルエンザウイルスに感染した哺乳動物被験体を処置する際に使用され得る。

30

【0105】

ある特定の実施形態は、(i) 一本鎖であり、(ii) 分節型であり、かつ(iii) マイナス極性であるゲノムを有するRNAウイルスを標的にする。標的にされるウイルスは、プラス極性を有するマイナスセンスビリオンRNA(vRNA)の、2つの異なるバージョンのゲノム相補鎖(genomic complement)を合成する：1) マイナスセンスビリオンRNAの複製のための鋳型として使用されるcRNA、および2) ウイルスタンパク質の翻訳のために使用される相補的なプラスセンスRNA(mRNA)。図3は、本発明に記載されるこれらの異なるRNA種およびアンチセンスPMOの標的位置を示している例示的な概略図である。

40

【0106】

標的にされるウイルスの科としては、Influenzavirus A属、Influenzavirus B属およびInfluenzavirus C属を含むOrthomyxoviridae科のメンバーが挙げられる。Orthomyxoviridae科のメンバーの様々な物理的特性、形態学的特性および生物学的特性は、例えば、Textbook of Human Virology, R. Belshé, ed., 2nd Edition, Mosby, 1991、International Commi

50

ttee on Taxonomy of VirusesのUniversal Virus Database (www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/index.htm) およびヒトウイルス学のテキスト (例えば、(Strauss and Strauss 2002) を参照のこと) に見られ得る。Orthomyxoviridae科のウイルスの鍵となる生物学的特性のいくつかは、下に記載される。

【0107】

Influenzavirus A、Influenzavirus BおよびInfluenzavirus Cウイルスは、それぞれ、インフルエンザウイルスA属、インフルエンザウイルスB属およびインフルエンザウイルスC属の唯一のメンバーである。これらのウイルスは、膜に囲まれたウイルスであり、そのゲノムは、RNAの分節型のマイナスセンス (すなわちマイナス) 鎖 ((-) RNA) である。10個のインフルエンザウイルス遺伝子が、AおよびB株の一本鎖RNAの8つのセグメント上、およびC株の一本鎖RNAの7つのセグメント上に存在する。それらのセグメントは、サイズが異なり (890~2341ヌクレオチド長)、各々が、異なるmRNAの合成のための鋳型である。インフルエンザウイルスビリオンは、これらの鋳型からのmRNAの合成に必要なウイルス特異的RNAポリメラーゼを含み、そのような特異的ポリメラーゼの非存在下では、インフルエンザウイルスRNAのマイナス鎖は、感染性でない。それらのmRNAの転写の開始は、インフルエンザウイルスmRNAポリメラーゼが、細胞のmRNAまたはmRNA前駆体の5'末端から12~15ヌクレオチドを拝借し、借用したオリゴヌクレオチドをプライマーとして使用するとき、生じる。このプロセスは、5'キャップ構造をウイルスのmRNA上に置くので、「キャップ・スナッチング」と呼ばれている。一般に、このプロセスによって生成されるmRNAは、ただ1つのタンパク質をコードする。また、M遺伝子およびNS遺伝子のウイルスRNAセグメントは、スプライスされるmRNAをコードし、それにより、これらの2つのセグメントの各々について2つの異なるタンパク質が生成される。

【0108】

インフルエンザウイルスRNAの複製は、核内で生じ、3つの異なる種のRNAの合成を含む。このプロセスの概略図が、図3に示されている。ナイーブな細胞の感染後、マイナス鎖ビリオンRNA (vRNA) は、核に運搬され、核において、翻訳されることになっているRNA (mRNA) が、ウイルスによってコードされた酵素によって、キャッピングされた細胞のプレmRNA分子から切断された5'末端の10~13ヌクレオチドプライマーを用いて合成される (すなわち、キャップ・スナッチング)。各mRNAの合成は、ゲノムセグメントの末端付近まで続き、そこでオリゴ (U) ストレッチに遭遇し、ポリ (A) テイルが付加される。特定の目的のウイルスmRNAが、翻訳のために細胞質に運搬され、そして、十分なウイルスタンパク質が核内に運搬された後、新生のビリオンになることになっているvRNAの合成が開始される。ゲノムvRNAの完璧な相補鎖であり、新しいvRNAを生成するための鋳型として働くvRNAの正確なアンチゲノムのコピーが合成される (cRNAと呼ばれる)。インフルエンザウイルス複製中に合成される種々のRNAが、図3に模式的に示されている。

【0109】

インフルエンザAのゲノムセグメントを表している例示的なウイルス核酸標的配列に対するGenBank参照が、下記の表1に列挙されている。表1のヌクレオチド配列番号は、プラス鎖RNAに対するGenbank参照から得られる。これらの配列は、文献の利用可能な遺伝子配列データベースまたは特許リソースから入手可能であり得るように、Orthomyxoviridae科における他の配列の単なる例示であることが理解されるだろう。配列番号1~11と特定される下記の配列は、本明細書の終わりの配列表にも列挙されている。

【0110】

表1は、ゲノムセグメント7によってコードされるインフルエンザAウイルス遺伝子M1およびM2に対する標的を列挙している。表1の標的配列は；1) マイナスセンスウ

10

20

30

40

50

ルスRNAの3'末端の25塩基（配列番号4）；2）プラスセンスmRNAの5'末端の末端の25塩基（配列番号3）；3）記載のインフルエンザウイルス遺伝子のAUG開始コドンの周辺の45塩基（配列番号2）を表している。示されている配列は、マイナス鎖の配列（すなわち、ゲノムRNAまたはビリオンRNA）である配列番号4を除いて、5'から3'への向きでのプラス鎖（すなわち、アンチゲノムまたはmRNA）配列である。標的がマイナス鎖vRNAであるとき、標的にされる配列は、別段述べられない限り（例えば、配列番号4）、表1に列挙される配列の相補鎖であることが明らかであり得る。

【0111】

M1およびM2タンパク質は、それぞれ、ウイルスのマトリックスタンパク質およびイオンチャンネル活性の構成要素である。これら2つのタンパク質は、同じAUG開始部位を利用するセグメント7vRNAの選択的スプライシング型から生成される。M2タンパク質は、2つの現行の抗インフルエンザ治療薬であるアマンタジンおよびリマントジンの標的である。M1/M2遺伝子のAUG開始コドン領域（AUG開始コドンに対して-20から+25）に対する例示的な標的配列は、配列番号1として列挙されている末端の60ヌクレオチド領域の部分配列である配列番号2として表されている。M1/M2セグメントの3'末端の標的配列（25ヌクレオチド）は、これも末端の60ヌクレオチド領域の部分配列である配列番号3によって表されており、そのセグメントのプラス鎖（vRNA）とマイナス鎖（vRNA）の両方において標的にされ得る。その5'末端の配列（配列番号3）は、配列番号4として下記に示されるマイナス鎖において首尾良く標的にされ得る。配列番号1～4は、2009H1N1ウイルス（S-OIV）由来であり、アクセッション番号GQ332646としてGenBankデータベースに見られるウイルスの例示的な単離株由来である。他の参照インフルエンザA亜型の5'末端の60ヌクレオチド領域は、H1N1、H5N1、H3N2およびH2N2に対してそれぞれ配列番号5、6、7、8として表1に列挙される。対応するAUGおよび末端の標的領域は、上に記載された指針を用いてこれらのウイルスの配列から得られ得る。

【0112】

M1/M2セグメントのスプライス供与領域およびスプライス受容領域を標的にすることも可能である。そのスプライス供与部位およびスプライス受容部位は、それぞれヌクレオチド51および740である。本発明のアンチセンス化合物を用いていずれかのスプライスジャンクションを標的にすることが企図される。さらに、適切に設計されたアンチセンス化合物（例えば、配列番号12～16および19～22）を用いて、AUG開始部位とスプライス供与部位の両方を阻止することも可能である。標的とするスプライス受容領域は、2009H1N1（S-OIV）亜型について、配列番号10として下記に示される。H5N1亜型の場合の対応する領域は、表1に配列番号9として列挙されている。

【0113】

さらに、M1/M2セグメントの任意の翻訳感受性、スプライシング感受性または複製感受性の領域が、本発明の化合物を用いて標的にされ得ることが企図される。プロトタイプのH1N1亜型（プエルトリコ/8/34）に対する参照M1/M2（セグメント7）配列は、表1に配列番号11として示され、GenBank Reference SequenceデータベースにおいてNC_002016として見られ得る。対応するM1/M2セグメント配列は、公的に利用可能な配列データベースから得ることができる。追加の翻訳感受性、スプライシング感受性および/または複製感受性の標的領域が同定され得るという見込みで、本発明のアンチセンス化合物がこのセグメントの他の領域を標的にし得ると企図される。

表1：例示的なインフルエンザウイルス核酸標的配列

【0114】

10

20

30

40

【表 1 - 1】

<u>名称</u>	<u>NCBI 番号</u>	<u>Nct 領域</u>	<u>配列 (5'から3')</u>	<u>配列 番号</u>
M1/M2-trgt 2009H1N1	GQ332 646	1-60	AGCAAAAGCAGGUAGAUUUUAAAGAUGAGU CUUCUAACCGAGGUCGAAAC/GUACGUUCU	1
M1/M2-AUG	GQ332 646	6-50	AAGCAGGUAGAUUUUAAAGAUGAGUCUUC UAACCGAGGUCGAAA	2
M1/M2- vc5'trm	GQ332 646	1-25	AGCAAAAGCAGGUAGAUUUUAAAG	3
M1/M2- v3'trm	GQ332 646	1072- 1097	CUUUAAUAUCUACCUGCUUUUGCU	4

【 0 1 1 5】

【表 1 - 2】

M1/M2-trgt H1N1con	NC_00 2016	1-60	AGCGAAAGCAGGUAGAUUUGAAAGAUGAGU CUUCUAACCGAGGUCGAAAC/GUACGUUCU	5
M1/M2-trgt H5N1con	NC_00 7363	1-60	AGCAAAAGCAGGUAGAUUUGAAAGAUGAGU CUUCUAACCGAGGUCGAAAC/GUACGUUCU	6
M1/M2-trgt H3N2con	NC_00 7367	1-60	AGCAAAAGCAGGUAGAUUUGAAAGAUGAGC CUUCUAACCGAGGUCGAAAC/GUAUGUUCU	7
M1/M2-trgt H2N2con	NC_00 7377	1-60	AGCAAAAGCAGGUAGAUUUGAAAGAUGAGU CUUCUAACCGAGGUCGAAAC/GUACGUUCU	8
M1/M2-SA H5N1	NC_00 7363	730- 780	AAAUUUGCAG/GCCUACCAGAAACGAAUGGG AGUGCAGAUGCAGCGAUUCAA	9
M1/M2-SA 2009H1N1	GQ332 646	730- 780	AAAUUUGCAG/GCCUACCAGAAGCGAAUGGG AGUGCAGAUGCAGCGAUUCAA	10
M1/M2 H1N1 セグメント 7	NC_00 2016	1-1027	AGCGAAAGCAGGTAGATATTGAAAGATGAGT CTTCTAACCGAGGTGAAACGTACGTTCTCT CTATCATCCCGTCAGGCCCCCTCAAAGCCGA GATCGCACAGAGACTTGAAGATGTCTTTGCA GGGAAGAACACCGATCTTGAGGTTCTCATGG AATGGCTAAAGACAAGACCAATCCTGTCAAC TCTGACTAAGGGGATTTTAGGATTGTGTTC ACGCTCACCGTGCCAGTGAGCGAGGACTGC AGCGTAGACGCTTTGTCCAAAATGCCCTTAA TGGAACCGGGATCCAATAACATGGACAAA GCAGTTAACTGTATAGGAAGCTCAAGAGGG AGATAACATTCCATGGGGCCAAAGAAATCTC ACTCAGTTATTCTGCTGGTGCACTTGCCAGT TGTATGGGCCTCATATACAACAGGATGGGG CTGTGACCACTGAAGTGGCATTTGGCCTGGT ATGTGCAACCTGTGAACAGATTGCTGACTCC CAGCATCGGTCTCATAGGCAAATGGTGACAA CAACCAACCCACTAATCAGACATGAGAACAG AATGGTTTTAGCCAGCACTACAGCTAAGGCT ATGGAGCAAATGGCTGGATCGAGTGAGCAAG CAGCAGAGGCCATGGAGTTGCTAGTCAGGC TAGGCAAATGGTGCAAGCGATGAGAACCAT GGGACTCATCCTAGCTCCAGTGCTGGTCTGA AAAATGATCTTCTTGAAAATTTGCAGGCCTA TCAGAAACGAATGGGGGTGCAGATGCAACGG TTCAAGTGATCCTCTCGCTATTGCCGCAAAT ATCATTGGGATCTTGCACTTGATATTGTGGA	11

【表 1 - 3】

			TTCTTGATCGTCTTTTTTTCAAATGCATTTA CCGTCGCCTTTAAATACGGACTGAAAGGAGGG CCTTCTACGGAAGGAGTGCCAAAGTCTATGA GGGAAGAATATCGAAAGGAACAGCAGAGTGC TGTGGATGCTGACGATGGTCATTTTGTTCAGC ATAGAGCTGGAGTAAAAAACTACCTTGTTTC TACT	
--	--	--	--	--

図 4 A は、インフルエンザ A の重要な亜型：H1N1、H1N1 (S-OIV)、H5N1、H3N2、H9N2 および H7N7 由来の M1/M2 セグメントの 5' 末端の 60 スクレオチドの保存を示している。図 4 B は、ゲノム配列の NCBI インフルエンザデータベースに基づいて (Bao Y., P. Bolotov, D. Dernovoy, B. Kiryutin, L. Zaslavsky, T. Tatusova, J. Ostell, and D. Lipman. The Influenza Virus Resource at the National Center for Biotechnology Information. J. Virol. 2008 Jan; 82 (2): 596-601) 好ましい PMO (M1/M2-AUG; 配列番号 12) の各塩基に対する、インフルエンザの 1 つの重要な血清型である、ブタ起源のインフルエンザ A (S-OIV) としても知られる H1N1 (2009) における標的配列の保存を示している。大文字は、標的塩基を示しており、その塩基の隣の下付きの数字は、配列の上に示されるそのデータベース内の H1N1 (2009) 単離株についてのその塩基に対する保存パーセントを示している。これらのデータは、塩基の位置が、H1N1 (2009) に対する M1/M2-AUG 標的についていかなる有意なバリエーションも示していないことを示している。

【0117】

ある特定の実施形態において、アンチセンス標的化配列は、表 1 に列挙される標的配列のうちの 1 つ以上の領域にハイブリダイズするように設計される。選択されたアンチセンス標的化配列は、例えば、約 12 塩基またはそれ以上、例えば、約 40 塩基短く作製され得、その配列が、標的とのハイブリダイゼーションの際に、翻訳、スプライシングおよび/または複製の阻害をもたらすのに十分相補的である限り、少数のミスマッチを含み得、45℃以上の Tm を有するヘテロ二重鎖をウイルス RNA と形成する。

【0118】

ある特定の実施形態において、標的配列とアンチセンス標的化配列との間の相補性の程度は、安定な二重鎖を形成するのに十分である。標的 RNA 配列とアンチセンスオリゴマーとの相補性の領域は、8~11 塩基もの長さであり得るが、好ましくは、12~15 塩基またはそれ以上、例えば、12~20 塩基または 12~25 塩基（これらの範囲の間のすべての整数を含む）である。約 14~15 塩基のアンチセンスオリゴマーは、一般に、ウイルスゲノム内で唯一の相補的な配列を有するのに十分長い。ある特定の実施形態において、下記で論じられるように、必要な結合 Tm を達成する最も短い長さの相補的な塩基が要求されることがある。

【0119】

ある特定の実施形態において、40 塩基もの長さのオリゴマーが適当である場合があり、ここで、少なくとも最小数の塩基、例えば、10~12 塩基が、標的配列と相補的である。しかしながら、一般に、細胞における促進性の取り込みまたは能動的な取り込みが、約 30 未満のオリゴマー長において最適化される。下記にさらに記載される PMO オリゴマーの場合、結合安定性と取り込みとの最適なバランスは、一般に、18~25 塩基の長さにおいて生じる。約 10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39 または 40 塩基からなるアンチセンスオリゴマ

ー（例えば、PNA、LNA、2'-OMe）およびPMOオリゴマーが含まれ、ここで、少なくとも約6、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39または40個連続した塩基または連続していない塩基が、配列番号1～11の標的配列またはそれらのバリエーションと相補的である。

【0120】

ある特定の実施形態において、アンチセンスオリゴマーは、ウイルス核酸標的配列と100%相補的であってもよいし、オリゴマーとウイルス核酸標的配列との間に形成されるヘテロ二重鎖が、細胞のヌクレアーゼの作用およびインビボで生じ得る他の分解形式に耐えるのに十分に安定である限り、例えばバリエーションに適応させるために、ミスマッチを含んでもよい。ヌクレアーゼによる切断にそれほど影響されやすすくないオリゴマー骨格は、下で論じられる。ミスマッチは、存在する場合、中央よりもハイブリッド二重鎖の末端領域のほうが不安定にしない。許容されるミスマッチの数は、十分に理解されている二重鎖安定性の原理に従って、オリゴマーの長さ、二重鎖内のG:C塩基対のパーセンテージ、および二重鎖内のミスマッチの位置に依存し得る。そのようなアンチセンスオリゴマーは、必ずしもウイルス核酸標的配列と100%相補的でないが、それは、核酸標的の生物学的活性、例えば、ウイルスタンパク質の発現が調節されるように、標的配列と安定的かつ特異的に結合するのに有効である。

【0121】

オリゴマーと標的配列との間で形成される二重鎖の安定性は、結合 T_m と、細胞の酵素的切断に対する二重鎖の感受性との関数である。相補的な配列のRNAに関して、アンチセンス化合物の T_m は、従来する方法（例えば、Hamesら、Nucleic Acid Hybridization, IRL Press, 1985, pp. 107-108によって記載されているかまたはMiyada C. G. and Wallace R. B., 1987, Oligonucleotide Hybridization Techniques, Methods Enzymol. Vol. 154 pp. 94-107に記載されているような方法）によって測定され得る。ある特定の実施形態において、アンチセンスオリゴマーは、相補的な配列のRNAに関して、体温より高い結合 T_m 、好ましくは、約45℃または50℃より高い結合 T_m を有し得る。60～80℃の範囲内またはそれ以上の T_m が好ましい。周知の原理に従って、オリゴマー化合物の T_m は、相補性に基づくRNAハイブリッドに関して、二重鎖内の対になっているC:G塩基の比を高めることによって、および/またはヘテロ二重鎖の長さ（塩基対）を伸ばすことによって、上昇し得る。同時に、細胞の取り込みを最適化する目的で、オリゴマーのサイズを限定することにも有益であり得る。このため、25塩基以下の長さで高い T_m （45～50℃またはそれ以上）を示す化合物が、高い T_m 値のために25塩基より長い長さを求める化合物よりも一般に好ましい。

【0122】

PMOオリゴマーなどのある特定の実施形態において、オリゴマーのアンチセンス活性は、図1Bに例証されるような、非荷電のホスホロジアミデート結合とカチオン性のホスホロジアミデート結合との混合物を用いることによって、増大され得る。オリゴマー内のカチオン性結合の総数は、1～10個と様々であり得（これらの間のすべての整数を含む）、オリゴマー全体にわたって散在し得る。好ましくは、荷電結合の数は、少なくとも2つ、かつ骨格結合の総数の半数以下であり、例えば、2、3、4、5、6、7または8つの正に帯電した結合であり、好ましくは、各荷電結合は、骨格に沿って、少なくとも1、2、3、4または5つの非荷電結合によって分断される。様々なオリゴマーのアンチセンス活性は、オリゴマー標的領域を5'末端のレポーター遺伝子（例えば、ホタルルシフェラーゼ）に融合し、次いで、無細胞翻訳アッセイにおいてその融合遺伝子のmRNA転写物の翻訳の阻害を測定することによって、インビトロにおいて測定され得る。非荷電結合とカチオン性結合との混合物を含むオリゴマーの阻害特性は、無細胞翻訳アッセイにおい

て約 5 ～ 1 0 0 倍増大され得る。オリゴマー全体にわたって散在する、図 1 B および図 2 に例証されるような 3 つのカチオン性結合を含む形態の本発明の好ましいアンチセンスオリゴマー (M1/M2-AUG) は、下記の表 2 において配列番号 13 として示されている。M1/M2-AUG を標的にし、かつ散在する 3 つのカチオン性結合を含む一連の例示的なアンチセンスオリゴマーは、配列番号 34 ～ 47 として示されている。

【0123】

下記の表 2 は、インフルエンザ A ウイルスと相補的である例示的な標的化配列を、5' から 3' への向きで示している。列挙される配列は、上で述べられた一般的な分類規則に従って、標的化配列が選択され得る標的化配列のコレクションを提供する。列挙される標的化配列は、任意のアンチセンスアナログオリゴヌクレオチド化学 (例えば、PNA、LNA または 2'-OMe) について使用され得るが、表 2 の配列は、PMO アンチセンスオリゴマーとして使用するために好ましい。配列番号 12 ～ 22、25 ～ 29 および 34 ～ 47 は、そのウイルスのプラス鎖 (mRNA または vRNA) に対するアンチセンスであるのに対し、配列番号 23 および 24 は、マイナス鎖 (vRNA) に対するアンチセンスである。したがって、例えば、M1/M2 をコードするセグメント (インフルエンザ A のセグメント 7) のマイナス鎖の 3' 末端に対して標的を選択する際、配列番号 4、またはそのマイナス鎖の 3' 末端の機能を阻止するのに有効な配列の一部が選択され得る。配列番号 12 ～ 29 および 34 ～ 47 は、インフルエンザ A 亜型 H1N1 (S-OIV) の M1/M2 セグメントを標的にするのにに対し、配列番号 30 ～ 33 は、示されるように PB1 または NP セグメントを標的にする。

表 2. 例示的なアンチセンス標的化配列

【0124】

【表 2-1】

PMO 名	標的 Ncts.	アンチセンスオリゴマー(5' から3')	配列 番号
M1/M2-AUG	22-41	CGGTTAGAAGACTCATCTTT	12
M1/M2-AUGplus	22-41	CGGT+TAGAAGAC+TCATC+TTT	13
M1/M2-AUG.20.17	17-36	AGAAGACTCATCTTTCAATA	14
M1/M2-AUG.20.19	19-38	TTAGAAGACTCATCTTTCAA	15
M1/M2-AUG.20.24	24-43	CTCGGTTAGAAGACTCATCT	16
M1/M2-vcTerm.25.3	3-27	ATCTTTCAATATCTACCTGCTTTTG	17
M1/M2-vcTerm.25.6	6-30	CTCATCTTTCAATATCTACCTGCTT	18
M1/M2-AUG.25.19	19-43	CTCGGTTAGAAGACTCATCTTTCAA	19
M1/M2-AUG.25.21	21-45	ACCTCGGTTAGAAGACTCATCTTTC	20
M1/M2-AUG.25.24	24-48	TCGACCTCGGTTAGAAGACTCATCT	21
M1/M2-AUG.25.26	26-50	TTTCGACCTCGGTTAGAAGACTCAT	22
M1/M2-3'vTerm.25.1003	1003- 1027	AGCAAAAGCAGGTAGATATTGAAAA	23
M1/M2-3'vTerm.25.997	997-	AGCAGGTAGATATTGAAAAATGAGT	24

【 0 1 2 5 】

【表 2 - 2 】

	1021		
M1/M2-SA.24.738	738-761	CTCCCATTCGCTTCTGGTAGGCCT	25
M1/M2-SA.24.740	740-762	CACTCCCATTCGCTTCTGGTAGGC	26
M1/M2-SA.24.742	742-764	TGCACTCCCATTCGCTTCTGGTAG	27
M1/M2-SA.24.744	744-766	TCTGCACTCCCATTCGCTTCTGGT	28
M1/M2-SA.24.746	746-768	CATCTGCACTCCCATTCGCTTCTG	29
NP-v3'		AGCAAAAGCAGIGTAGATAATC	30
NP-v3'plus		AGCAAAAGCAGIG+TAGA+TAA+TC	31
PB1-AUG+15		CGGATTGACATCCATTCAAATG	32
PB1-AUG+15plus		CGGAT+TGACA+TCCAT+TCAAATG	33
M1/M2-AUG.20.6+	6-25	CTT+TCAA+TATCTACC+TGCTT	34
M1/M2-AUG.20.11+	11-30	C+TCA+TCTTTCAA+TATCTACC	35
M1/M2-AUG.20.12+	12-31	AC+TCA+TCTTTCAA+TATCTAC	36
M1/M2-AUG.20.13+	13-32	GAC+TCA+TCTTTCAA+TATCTA	37
M1/M2-AUG.20.14+	14-33	AGAC+TCA+TCTTTCAA+TATCT	38
M1/M2-AUG.20.15+	15-34	AAGAC+TCA+TCTTTCAA+TATC	39
M1/M2-AUG.20.16+	16-35	GAAGAC+TCA+TCTTTCAA+TAT	40
M1/M2-AUG.20.17+	17-36	AGAAGAC+TCA+TCTTTCAA+TA	41
M1/M2-AUG.20.18+	18-37	TAGAAGAC+TCA+TCTTTCAA+T	42
M1/M2-AUG.20.19+	19-38	T+TAGAAGAC+TCA+TCTTTCAA	43
M1/M2-AUG.20.20+	20-39	GT+TAGAAGAC+TCA+TCTTTCA	44
M1/M2-AUG.20.23+	23-42	TCGGT+TAGAAGAC+TCA+TCTT	45
M1/M2-AUG.20.25+	25-44	CCTCGGT+TAGAAGAC+TCA+TC	46
M1/M2-AUG.20.27+	27-46	GACC+TCGGT+TAGAAGAC+TCA	47

アンチセンスオリゴヌクレオチド化合物

上で詳述されたように、アンチセンスオリゴヌクレオチド（用語「アンチセンス」は、その化合物がウイルスのプラスセンス鎖RNAまたはマイナスセンス鎖もしくはマイナス鎖を標的にしていることを示す）は、代表的には、以下のうちの1つ以上；1）マイナスセンスウイルスRNAの5'もしくは3'末端の25塩基；2）プラスセンスv.cRNAの5'もしくは3'末端の末端の30塩基；3）ウイルスmRNAのAUG開始コドンの周辺の45塩基、および／または；4）選択的スプライシングに供されるインフルエンザ

10

20

30

40

50

mRNAのスプライス供与部位もしくはスプライス受容部位の周辺の50塩基を含む領域を標的にする塩基配列を含む。さらに、そのオリゴマーは、宿主細胞、例えば、感染した哺乳動物被験体内の宿主細胞に投与されたとき、例えば、標的タンパク質の発現（例えば、M1もしくはM2または両方）を減少させるか、ウイルスの複製を減少させるか、またはその両方によって、感染しているウイルスを効果的に標的にすることができる。この要件は、代表的には、オリゴマー化合物が、(a)哺乳動物細胞によって能動的に取り込まれる能力を有するとき、および(b)いったん取り込まれると、約45℃より高いT_mで標的RNAと二重鎖を形成するときに満たされる。

【0126】

ある特定の実施形態において、オリゴマー骨格は、実質的に非荷電であり得、好ましくは、細胞膜を越えた能動輸送または促進輸送に対する基質として認識され得る。オリゴマーが標的RNAと安定な二重鎖を形成する能力は、オリゴマー骨格の他の特徴（アンチセンスオリゴマーの長さおよび標的に対する相補性の程度、G:C塩基マッチとA:T塩基マッチとの比、ならびに任意のミスマッチしている塩基の位置を含む）にも関し得る。アンチセンスオリゴマーが細胞のヌクレアーゼに抵抗する能力は、その物質の残存および細胞質への最終的な送達を促進し得る。PMO骨格化学を使用する本発明の例示的なアンチセンスオリゴマー標的化配列は、上記の表2に列挙されている。代替化学を使用する標的化配列が、PNAおよびLNA化学について、それぞれ下記の表3および4に列挙される。一般に、PNAおよびLNA化学は、PMOおよび2'-O-Meオリゴマーと比べて相対的に高い標的結合強度に起因して、より短い標的化オリゴマーを利用する。

【0127】

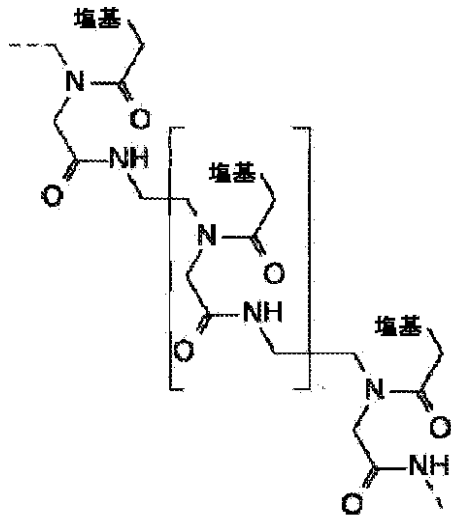
ペプチド核酸（PNA）は、DNAのアナログであり、その骨格は、ピリミジンまたはプリン塩基が付着されたN-（2-アミノエチル）グリシンユニットからなるデオキシリボース骨格と構造的に同形である。天然のピリミジンおよびプリン塩基を含むPNAは、ワトソン-クリック塩基対形成の法則に従って、相補的なオリゴヌクレオチドにハイブリダイズし、また、塩基対認識に関してDNAによく似ている（Egholm, Buchardtら、1993）。PNAの骨格は、ホスホジエステル結合ではなくペプチド結合によって形成され、そのおかげでアンチセンスの用途にとって適切になる（下記の構造を参照のこと）。その骨格は、非荷電であり、その結果、通常の熱安定性よりも高い熱安定性を示すPNA/DNAまたはPNA/RNA二重鎖が生じる。PNAは、ヌクレアーゼまたはプロテアーゼによって認識されない。

【0128】

PNAは、当該分野で公知の任意の手法を用いて合成的に生成され得る。PNAは、下記に例証されるような、従来のDNAのリン酸リボース環をポリアミド骨格が置き換えているDNAアナログである。

【0129】

【化 3】



10

天然の構造に対してラジカル構造が変化しているにもかかわらず、PNAは、らせん型でDNAまたはRNAに配列特異的に結合することができる。PNAの特徴としては、相補DNAまたは相補RNAに対する高い結合親和性、一塩基のミスマッチによって引き起こされる不安定化作用、ヌクレアーゼおよびプロテアーゼに対する抵抗性、塩濃度と無関係なDNAまたはRNAとのハイブリダイゼーション、ならびにホモプリンDNAとの三重鎖形成が挙げられる。PANAGENE（商標）は、その専売のBts PNAモノマー（Bts；ベンゾチアゾール-2-スルホニル基）および専売のオリゴマー化プロセスを開発した。Bts PNAモノマーを用いるPNAオリゴマー化は、脱保護、結合およびキャッピングの反復サイクルから構成される。この技術に対する例示的な特許としては、米国特許第6,969,766号、同第7,211,668号、同第7,022,851号、同第7,125,994号、同第7,145,006号および同第7,179,896号が挙げられる。PNA化合物の調製を教示している代表的な米国特許としては、米国特許第5,539,082号；同第5,714,331号；および同第5,719,262号（これらの各々が本明細書中で参考として援用される）が挙げられるが、これらに限定されない。PNA化合物に関するさらなる教示は、Nielsenら、Science, 254:1497-1500, 1991に見られ得る。

20

30

【0130】

本発明を実施するための例示的なPNA化合物は、下記の表3に列挙される。これらのオリゴヌクレオチドは、本明細書中で引用される参考文献に示される手順に本質的に従って調製され得る。

【0131】

表3. 例示的なPNAアンチセンス標的化配列

【0132】

【表 3】

PNA 名	標的 Ncts.	アンチセンスオリゴマー(5' から3')	配列 番号
PNA-M1-AUG.20.22	22-41	CGGTTAGAAGACTCATCTTT	48
PNA-M1-AUG.18.24	24-41	CGGTTAGAAGACTCATCT	49
PNA-M1-AUG.16.26	16-41	CGGTTAGAAGACTCAT	50
PNA-M1-AUG.20.17	17-36	AGAAGACTCATCTTTCAATA	51
PNA-M1-AUG.20.19	19-38	TTAGAAGACTCATCTTTCAA	52
PNA-M1-AUG.20.24	24-43	CTCGGTTAGAAGACTCATCT	53
PNA-M1-vcTerm.20.3	3-22	TCAATATCTACCTGCTTTTG	54
PNA-M1-vcTerm.20.6	6-25	CTTTCAATATCTACCTGCTT	55
PNA-M1-3'vTrm.20.1008	1003- 1027	AGCAAAAGCAGGTAGATATT	56
PNA-M1-3'vTrm.20.1002	1002- 1021	AGCAGGTAGATATTGAAAAA	57
M1-SA.20.738	738-757	CATTGCTTCTGGTAGGCCT	58
M1/M2-SA.24.740	740-759	CCCATTGCTTCTGGTAGGC	59
M1/M2-SA.24.742	742-761	CTCCCATTCGCTTCTGGTAG	60
M1/M2-SA.24.744	744-763	CACTCCCATTCGCTTCTGGT	61
M1/M2-SA.24.746	746-765	TGCACTCCCATTCGCTTCTG	62

本発明のオリゴヌクレオチド化合物は、「ロクト核酸」サブユニット (LNA) も含み得る。LNA の構造は、例えば、Wengel ら、Chemical Communications (1998) 455; Tetrahedron (1998) 54:3607 および Accounts of Chem. Research (1999) 32:301; Obika ら、Tetrahedron Letters (1997) 38:8735; (1998) 39:5401 および Bioorganic Medicinal Chemistry (2008) 16:9230 に見られ得る。非限定的で例示的な LNA 構造を下記に例証する：

【0133】

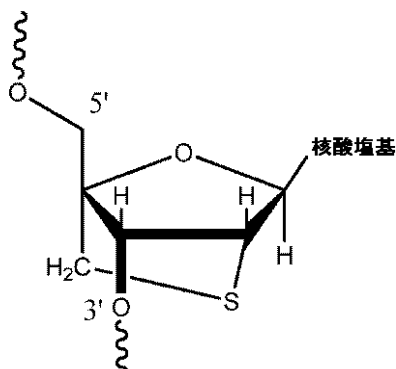
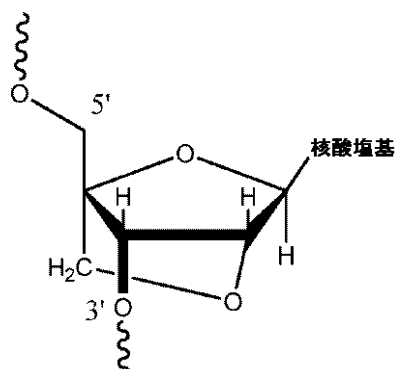
10

20

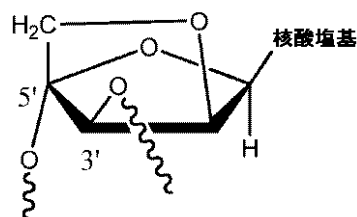
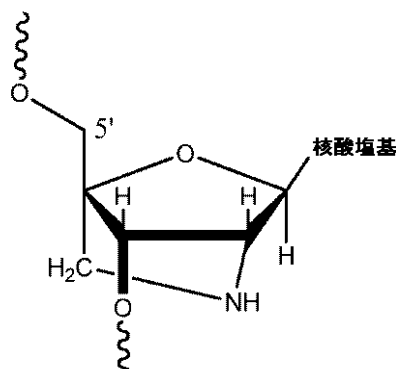
30

40

【化 4】



10



20

本発明の化合物は、1つ以上のLNAを組み込み得；場合によっては、本化合物は、完全にLNAから構成され得る。個別のLNAヌクレオシドサブユニットを合成するための方法およびそのサブユニットをオリゴヌクレオチドに組み込むための方法は、当該分野で公知である：米国特許第7, 572, 582号、同第7, 569, 575号、同第7, 084, 125号、同第7, 060, 809号、同第7, 053, 207号、同第7, 034, 133号、同第6, 794, 499号および同第6, 670, 461号。代表的なサブユニット間リンカーとしては、ホスホジエステル部分およびホスホロチオエート部分が挙げられる；あるいは、リン（III）非含有リンカーを使用してもよい。好ましい実施形態は、各LNAサブユニットがDNAサブユニットによって分断されているLNA含有化合物である。さらに好ましい化合物は、LNAサブユニットとDNAサブユニットとの交互のものから構成され、ここで、そのサブユニット間リンカーは、ホスホロチオエートである。

30

【0134】

以下の化合物は、上で引用された参考文献に示される手順に本質的に従って調製される。LNAサブユニットを含む例示的な化合物を下記の表4に示す（LNAは大文字で書かれており、DNAは小文字であり、配列は5'から3'の向きである）。

40

【0135】

表4. 例示的なLNAアンチセンス標的化配列

【0136】

【表 4 - 1】

<u>LNA 名</u>	<u>配列 (5'-3')</u>	<u>配列番号</u>
LNA-AUG1	CgGtTaGaAgAcTcAtCtTt	63
LNA-AUG2	GaAgAcTcAt	64
LNA-AUG3	GAaGaCtCAT	65
LNA-AUG4	GAAGACTCAT	66
LNA-AUG5	AGAAGACTCA	67
LNA-AUG6	TAGAAGACTC	68
LNA-AUG7	TTAGAAGACT	69
LNA-AUG8	AAGACTCATC	70
LNA-AUG9	AGACTCATCT	71
LNA-AUG10	gAcTcAtCtT	72
LNA-AUG11	ACTCATCTTT	73
LNA-AUG12	CgGtTaGaAgAcTcAt	74
LNA-AUG13	GtTaGaAgAcTcAt	75
LNA-AUG14	GTTAGAAGACT	76
LNA-AUG15	CATCTTTAAAT	77
LNA-AUG16	CaTcTtTaAaTaTcTaC	78
LNA-AUG17	CGGTTAGAAGACTCAT	79
LNA-AUG18	GGTTAGAAGACTCATC	80

【 0 1 3 7 】

10

20

30

【表 4 - 2】

LNA-AUG19	GTTAGAAGACTCATCT	81
LNA-AUG20	TTAGAAGACTCATCTT	82
LNA-AUG21	TAGAAGACTCATCTTT	83
LNA-AUG22	AGAAGACTCATCTTTA	84
LNA-AUG23	GAAGACTCATCTTTAA	85
LNA-AUG24	AAGACTCATCTTTAAA	86
LNA-AUG25	AGACTCATCTTTAAAT	87
LNA-AUG26	GACTCATCTTTAAATA	88
LNA-AUG27	ACTCATCTTTAAATAT	89
LNA-AUG28	CTCATCTTTAAATATC	90
LNA-AUG29	TCATCTTTAAATATCT	91
LNA-AUG30	CATCTTTAAATATCTA	92
LNA-AUG31	ATCTTTAAATATCTAC	93
LNA-AUG32	TCTTTAAATATCTACC	94
LNA-AUG33	CTTTAAATATCTACCA	95
LNA-AUG34	TTTAAATATCTACCAG	96
LNA-AUG35	CgGgTaGaAgAcTcAt	97
LNA-AUG36	GgTtAgAaGaCtCaTc	98
LNA-AUG37	GtTaGaAgAcTcAtCt	99
LNA-AUG38	TtAgAaGaCtCaTcTt	100
LNA-AUG39	TaGaAgAcTcAtCtTt	101
LNA-AUG40	AgAaGaCtCaTcTtTa	102
LNA-AUG41	GaAgAcTcAtCtTtAa	103
LNA-AUG42	AaGaCtCaTcTtTaAa	104
LNA-AUG43	AgAcTcAtCtTtAaAt	105

10

20

30

40

【表 4－3】

LNA-AUG44	GaCtCaTcTtTaAaTa	106
LNA-AUG45	AcTcAtCtTtAaAtAt	107
LNA-AUG46	CtCaTcTaTaAaTaTc	108
LNA-AUG47	TcAtCtTtAaAtAtCt	109
LNA-AUG48	CaTcTtTaAaTaTcTa	110
LNA-AUG49	AtCtTtAaAtAtCtAc	111
LNA-AUG50	TcTtTaAaTaTcTaCc	112
LNA-AUG51	CtTtAaAtAtCtAcCa	113
LNA-AUG52	TtTaAaTaTcTaCcAg	114

好ましいオリゴマー構造は、上に記載されたような、非荷電結合によって結合される塩基対形成部分を有するモルホリノベースのサブユニットを使用する。実質的に非荷電のホスホロジアミデートによって連結されたモルホリノオリゴマーが、特に好ましい。アンチセンスオリゴマーを含むモルホリノオリゴヌクレオチドは、例えば、共同所有の米国特許第 5, 698, 685 号、同第 5, 217, 866 号、同第 5, 142, 047 号、同第 5, 034, 506 号、同第 5, 166, 315 号、同第 5, 185, 444 号、同第 5, 521, 063 号および同第 5, 506, 337 号、ならびに PCT 出願番号 US 2008/012804（これらのすべてが明確に参考として援用される）に詳述されている。

【0139】

モルホリノベースのサブユニットのある特定の特性としては：安定な非荷電の骨格結合によって、オリゴマー型として連結されることが可能であること；形成されたポリマーが、10～14 塩基もの短いオリゴマーでさえも高い Tm で相補的な塩基標的核酸（標的 RNA を含む）とハイブリダイズすることができるように、ヌクレオチド塩基（例えば、アデニン、シトシン、グアニンまたはウラシル）を支持することが可能であること；そのオリゴマーが能動的に哺乳動物細胞内に運搬されることが可能であること；およびそのオリゴマー：RNA ヘテロ二重鎖が RNase 分解に抵抗することが可能であることが挙げられる。

【0140】

リン含有骨格結合を有するモルホリノオリゴヌクレオチドの例は、図 1A～1C に例証される。好ましくはその骨格結合の 10%～50% において正に帯電した基を含むように本発明の 1 つの態様に従って改変される、図 1B に示されるようなホスホロジアミデートによって連結されたモルホリノオリゴヌクレオチドが、特に好ましい。非荷電の骨格結合を有するモルホリノオリゴヌクレオチド（アンチセンスオリゴヌクレオチドを含む）は、例えば、(Summerton and Weller, 1997) ならびに共同所有の米国特許第 5, 698, 685 号、同第 5, 217, 866 号、同第 5, 142, 047 号、同第 5, 034, 506 号、同第 5, 166, 315 号、同第 5, 185, 444 号、同第 5, 521, 063 号および同第 5, 506, 337 号、ならびに PCT 出願番号 US 2008/012804（これらのすべてが参考として援用される）に詳述されている。荷電骨格結合および／または改変された末端基を有する例示的なモルホリノオリゴヌクレオチド（アンチセンスオリゴヌクレオチドを含む）は、PCT 出願番号 US 2007/011435；同時係属中の米国仮出願番号 61/349, 783；および同時係属中の米国仮出願番号 61/361, 878（これらの各々はその全体が参考として援用され

10

20

30

40

50

る)に詳述されている。

【0141】

モルホリノベースのサブユニットの特性としては：1) 安定な非荷電のまたは正に帯電した骨格結合によって、オリゴマー型として連結されることが可能であること；2) 形成されたポリマーが、比較的短いオリゴヌクレオチド（例えば、10～15塩基）において約45℃より高いT_m値で相補的な塩基標的核酸（標的RNAを含む）とハイブリダイズすることができるように、ヌクレオチド塩基（例えば、アデニン、シトシン、グアニン、チミジン、ウラシルおよびヒポキサンチン）を支持することが可能であること；3) そのオリゴヌクレオチドが能動的または受動的に哺乳動物細胞内に運搬されることが可能であること；および4) そのアンチセンスオリゴヌクレオチド：RNAヘテロ二重鎖がそれぞれRNase分解およびRNaseH分解に抵抗することが可能であることが挙げられる。

10

【0142】

特許請求される主題のアンチセンスオリゴヌクレオチドに対する例示的な骨格構造としては、図1D～1Gに示されるモルホリノサブユニットタイプが挙げられ、それらの各々は、非荷電のまたは正に帯電したリン含有サブユニット結合によって連結される。図1Dは、5原子反復単位骨格を形成するリン含有結合を示しており、ここで、モルホリノ環は、1原子ホスホアミド結合によって連結されている。図1Eは、6原子反復単位骨格を生成する結合を示している。この構造では、5'モルホリノ炭素をリン基に連結している原子Yは、硫黄、窒素、炭素または好ましくは酸素であり得る。リンにぶら下がっているX部分は、フッ素、アルキルもしくは置換アルキル、アルコキシもしくは置換アルコキシ、チオアルコキシもしくは置換チオアルコキシ、または非置換、一置換もしくは二置換の窒素（モルホリンまたはピペリジンなどの環状構造を含む）であり得る。アルキル、アルコキシおよびチオアルコキシは、好ましくは、1～6個の炭素原子を含む。Z部分は、硫黄または酸素であり、好ましくは、酸素である。

20

【0143】

図1Fおよび1Gに示される結合は、7原子単位長骨格となるように設計されている。構造1Fでは、X部分は、構造1Eにおけるとおりであり、Y部分は、メチレン、硫黄または好ましくは酸素であり得る。構造1Gでは、XおよびY部分は、構造1Eにおけるとおりである。特に好ましいモルホリノオリゴヌクレオチドとしては、図1Eに示される形態のモルホリノサブユニット構造から構成されるものが挙げられ、ここで、X=NH₂、N(CH₃)₂もしくは1-ピペラジンまたは他の荷電基であり、Y=Oであり、かつZ=Oである。

30

【0144】

上で述べたように、実質的に非荷電のオリゴヌクレオチドは、荷電結合、例えば、2～5個の非荷電結合ごとに最大約1個（例えば、10個の非荷電結合ごとに約4～5個）を含むように、本発明の態様に従って改変され得る。ある特定の実施形態において、アンチセンス活性の最適な改善は、骨格結合の約25%がカチオン性であるときに見られ得る。ある特定の実施形態において、より少数の、例えば、10～20%のカチオン性結合のとき、またはカチオン性結合の数が50～80%の範囲内（例えば、約60%）である場合に、増強が見られ得る。

40

【0145】

本発明を支持して行われた追加実験は、カチオン性骨格の電荷が加えられたときに見られた増強が、場合によっては、その電荷の大部分をアンチセンスオリゴヌクレオチドの「中心領域」の骨格結合の近くに分布させることによって、例えば、8つのカチオン性骨格結合を含む20merのオリゴヌクレオチドにおいて、これらの荷電結合の少なくとも70%を真ん中の10個の結合に局在させることによって、さらに増大され得ることを示唆している。

【0146】

ある特定の実施形態において、アンチセンス化合物は、上で引用された参考文献におい

50

て詳述される方法、ならびに混合物または非荷電およびカチオン性の骨格結合を有するオリゴヌクレオチドの合成に関して下で詳述される方法を用いる、段階的な固相合成によって調製され得る。場合によっては、例えば、薬物動態を高めるためまたはその化合物の捕捉もしくは検出を容易にするために、追加の化学部分をアンチセンス化合物に付加することが望ましいことがある。そのような部分は、標準的な合成方法に従って、代表的にはオリゴマーの末端に共有結合的に付着され得る。例えば、ポリエチレングリコール部分または他の親水性ポリマー、例えば、10～100個のモノマーサブユニットを有するものの付加は、溶解性を高める際に有用であり得る。1つ以上の荷電基、例えば、有機酸などのアニオン性荷電基は、細胞の取り込みを増大させ得る。

【0147】

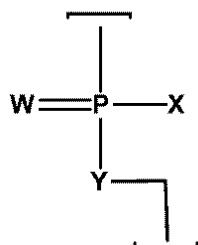
レポーター部分（例えば、フルオレセインまたは放射性標識基）が、検出の目的のために付着され得る。あるいは、オリゴマーに付着されるレポーター標識は、標識された抗体またはストレプトアビジンに結合することができるリガンド（例えば、抗原またはビオチン）であり得る。アンチセンス化合物の付着または改変のための部分を選択する際、当然のことながら、通常、生体適合性である基の化合物を選択すること、および望ましくない副作用なく被験体が許容する見込みがあることが望ましい。

【0148】

上で述べたように、ある特定のアンチセンス化合物は、上に記載されたタイプの非荷電結合の間に散在する、選択された数のカチオン性結合を含むように構築され得る。非荷電とカチオン性の両方のサブユニット間結合は、好ましくは、以下の構造：

【0149】

【化5】



を有するリン含有結合であり、
ここで、

Wは、SまたはOであり、好ましくは、Oであり、

X = NR¹R² または OR⁶ であり、

Y = O または NR⁷ であり、

そしてオリゴマー内の前記結合の各々は：

(a) 非荷電結合 (a) (ここで、R¹、R²、R⁶ および R⁷ の各々は、独立して、水素および低級アルキルから選択される)；

(b1) カチオン性結合 (b1) (ここで、X = NR¹R² かつ Y = O であり、NR¹R² は、必要に応じて置換されるピペラジノ基を表し、R¹R² = -CH(R³)CH(R⁴)- であり、

ここで、

各Rは、独立して、HまたはCH₃であり、

R⁴ は、H、CH₃ または電子対であり、そして

R³ は、H、低級アルキル、例えば、CH₃、C(=NH)NH₂、Z-L-NHC(=NH)NH₂ および [C(O)CH(R')NH]_mH から選択され、ここで：Zは、C(O)または直接の結合であり、Lは、アルキル、アルコキシおよびアルキルアミノから選択される結合を有する、最大18原子長、好ましくは、最大12原子長、より好ましくは、最大8原子長の随意のリンカーであり、R'は、天然に存在するアミノ酸の側鎖またはその1炭素もしくは2炭素のホモログであり、mは、1～6、好ましくは、1～4である)

;

(b 2) カチオン性結合 (b 2) (ここで、 $X = NR^1R^2$ かつ $Y = O$ であり、 $R^1 = H$ または CH_3 であり、 $R^2 = LNR^3R^4R^5$ であり、ここで、 L 、 R^3 および R^4 は、上で定義されたとおりであり、 R^5 は、 H 、低級アルキルまたは低級 (アルコキシ) アルキルである) ; および

(b 3) カチオン性結合 (b 3) (ここで、 $Y = NR^7$ かつ $X = OR^6$ であり、 $R^7 = LNR^3R^4R^5$ であり、ここで、 L 、 R^3 、 R^4 および R^5 は、上で定義されたとおりであり、 R^6 は、 H または低級アルキルである) ;

から選択され、そして少なくとも 1 つの前記結合は、カチオン性結合 (b 1)、(b 2) および (b 3) から選択される。

10

【0150】

ある特定の実施形態において、オリゴマーは、少なくとも 2 つの連続したタイプ (a) の結合 (すなわち、非荷電結合) を含み得る。さらなる実施形態において、オリゴマー内の結合の少なくとも 5 % は、カチオン性結合 (すなわち、タイプ (b 1)、(b 2) または (b 3)) であり; 例えば、10 % ~ 60 %、好ましくは、20 ~ 50 % の結合が、カチオン性結合であり得る。

【0151】

1 つの実施形態において、少なくとも 1 つの結合は、タイプ (b 1) であり、ここで、好ましくは、各 R は、 H であり、 R^4 は、 H 、 CH_3 または電子対であり、 R^3 は、 H 、低級アルキル、例えば、 CH_3 、 $C(=NH)NH_2$ および $C(O)-L-NHC(=NH)NH_2$ から選択される。 R^3 の後者の 2 つの実施形態は、それぞれ、ピペラジン環に直接付着されるかまたはリンカー基 L にぶら下がる、グアニジノ部分を提供する。合成を容易にするために、 R^3 中の可変部 Z は、好ましくは、示されるように $C(O)$ (カルボニル) である。

20

【0152】

上で述べたようなリンカー基 L は、アルキル (例えば、 $-CH_2-CH_2-$)、アルコキシ ($-C-O-$) およびアルキルアミノ (例えば、 $-CH_2-NH-$) から選択される結合をその骨格内に含むが、ただし、 L 内の末端の原子 (例えば、カルボニルまたは窒素に隣接する原子) は、炭素原子である。分枝状の結合 (例えば、 $-CH_2-CHCH_3-$) が可能であるが、リンカーは、好ましくは、非分枝状である。1 つの実施形態において、リンカーは、炭化水素リンカーである。そのようなリンカーは、構造 $-(CH_2)_n-$ を有し得、ここで、 n は、1 ~ 12、好ましくは、2 ~ 8、より好ましくは、2 ~ 6 である。

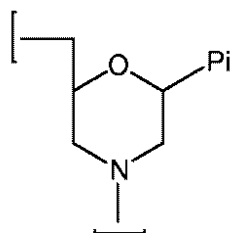
30

【0153】

モルホリノサブユニットは、以下の構造:

【0154】

【化 6】



40

(i)

を有し、ここで、 Pi は、塩基対形成部分であり、上で示された結合は、(i) の窒素原子を隣接サブユニットの 5' 炭素に接続する。塩基対形成部分 Pi は、同じであってもよいし、異なってもよく、通常、標的核酸に結合する配列を提供するように設計される。

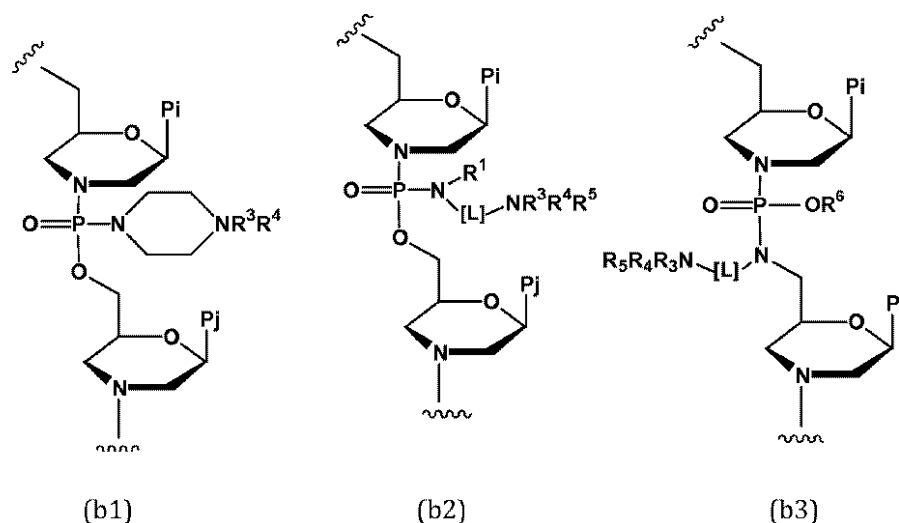
【0155】

50

モルホリノサブユニットを連結する上記の結合タイプ (b 1)、(b 2) および (b 3) の実施形態の使用は、以下のとおり図式的に例証され得る：

【 0 1 5 6 】

【 化 7 】



10

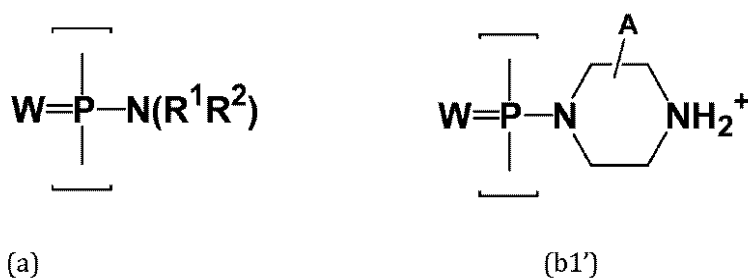
好ましくは、オリゴマー内のすべてのカチオン性結合が同じタイプである；すなわち、すべてタイプ (b 1)、すべてタイプ (b 2) またはすべてタイプ (b 3) である。

【 0 1 5 7 】

さらなる実施形態において、カチオン性結合は、下に示されるような結合 (b 1') および (b 1'') から選択され、ここで、(b 1') は、本明細書中で「P i p」結合と呼ばれ、(b 1'') は、本明細書中で「G u X」結合と呼ばれる：

【 0 1 5 8 】

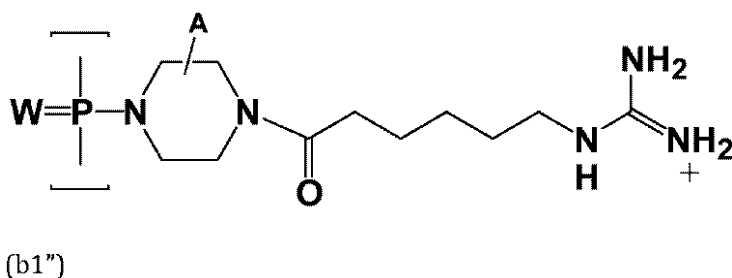
【 化 8 】



30

【 0 1 5 9 】

【 化 9 】



40

上記の構造において、Wは、SまたはOであり、好ましくは、Oであり；R¹およびR²の各々は、独立して、水素および低級アルキルから選択され、好ましくは、メチルであ

50

り；Aは、(b 1 ') および (b 1 ") 中の1つ以上の炭素原子上の水素または非干渉置換基を表す。好ましくは、ピペラジン環における環炭素は、非置換である；しかしながら、それらは、メチルまたはフッ素などの非干渉置換基を含み得る。好ましくは、多くても1つまたは2つの炭素原子がそのように置換される。さらなる実施形態において、結合の少なくとも10%が、タイプ (b 1 ') または (b 1 ") であり；例えば、結合の10%～60%、好ましくは、20%～50%が、タイプ (b 1 ') または (b 1 ") であり得る。

【0160】

ある特定の実施形態において、オリゴマーは、上記のタイプ (b 1 ') の結合を含まない。あるいは、オリゴマーは、タイプ (b 1) の結合 (各Rは、Hであり、R³は、HまたはCH₃であり、R⁴は、H、CH₃または電子対である) を含まない。

10

【0161】

モルホリノサブユニットは、少なくとも1つの結合が、上に記載されたようなペンダントカチオン基で改変された、下記でさらに記載されるようなリンベースでないサブユニット間結合によっても連結され得る。

【0162】

未改変の状態では非荷電であるがペンダントアミン置換基も有し得る他のオリゴヌクレオチドアナログ結合が使用され得る。例えば、モルホリノ環上の5'窒素原子は、スルファミド結合または尿素結合 (それぞれ、リングが炭素または硫黄で置き換えられている) において使用され得、上記の構造 (b 3) 内の5'窒素原子に類似の様式で改変され得る。

20

【0163】

任意の数のカチオン性結合を有するオリゴマー (完全にカチオン性結合によって連結されたオリゴマーを含む) が提供される。しかしながら、好ましくは、それらのオリゴマーは、部分的に、例えば、10%～80%が帯電している。好ましい実施形態において、結合の約10%～60%、好ましくは、20%～50%が、カチオン性である。

【0164】

1つの実施形態において、カチオン性結合は、骨格に沿って散在する。部分的に帯電したオリゴマーは、好ましくは、少なくとも2つの連続した非荷電結合を含む；すなわち、そのオリゴマーは、好ましくは、その長さ全体にわたって厳密に交互のパターンを有しない。

30

【0165】

カチオン性結合のブロックおよび非荷電結合のブロックを有するオリゴマーも考えられる；例えば、非荷電結合の中央のブロックが、カチオン性結合のブロックに隣接し得るか、またはその逆であり得る。1つの実施形態において、そのオリゴマーは、ほぼ等しい長さの5'領域、3'領域および中心領域を有し、その中心領域内のカチオン性結合のパーセンテージは、約50%より高く、好ましくは、約70%より高い。

【0166】

アンチセンスの用途で使用するためのオリゴマーは、通常、約10～約40個のサブユニット、より好ましくは、約10～30個のサブユニット、代表的には、15～25塩基の長さの範囲である。例えば、アンチセンス化合物にとって有用な長さである19～20個のサブユニットを有する本発明のオリゴマーは、理想的には、2～10個、例えば、4～8個のカチオン性結合を有し得、残りは、非荷電結合であり得る。14～15個のサブユニットを有するオリゴマーは、理想的には、2～7個、例えば、3、4または5個のカチオン性結合を有し得、残りは、非荷電結合であり得る。

40

【0167】

各モルホリノ環構造は、代表的には、処置される細胞内または被験体内において選択されたアンチセンス標的にハイブリダイズするように設計された塩基対形成部分の配列を形成する塩基対形成部分を支持する。その塩基対形成部分は、天然のDNAもしくはRNAに見られるプリンもしくはピリミジン (例えば、A、G、C、TまたはU)、またはアナログ (例えば、ヒポキサンチン (ヌクレオシドイノシンの塩基構成要素) または5-メチ

50

ルシトシン) であり得る。

【0168】

ペプチドトランスポーター

ある特定の実施形態において、本発明のアンチセンス化合物は、細胞内への化合物の輸送を増大するのに有効なアルギニンリッチペプチド輸送部分に結合体化されたオリゴヌクレオチド部分を含み得る。その輸送部分は、例えば、図1Cに示されるように、オリゴマーの末端に付着され得る。そのペプチド輸送部分は、好ましくは、X'サブユニット、Y'サブユニットおよびZ'サブユニットから選択される6～16個のサブユニットを含み、ここで、

(a) 各X'サブユニットは、独立して、リジン、アルギニンまたはアルギニンアナログを表し、前記アナログは、構造 $R^1 N=C(NH_2)R^2$ (ここで、 R^1 は、HまたはRであり； R^2 は、R、 NH_2 、 NHR または NR_2 であり、Rは、低級アルキルまたは低級アルケニルであり、かつ酸素または窒素をさらに含み得； R^1 および R^2 は、一体となって環を形成し得；側鎖は、 R^1 または R^2 を介して前記アミノ酸に連結される)の側鎖を含むカチオン性 α -アミノ酸であり；

(b) 各Y'サブユニットは、独立して、中性のアミノ酸 $-C(O)-(CHR)_n-NH-$ (ここで、nは、2～7であり、各Rは、独立して、Hまたはメチルである)を表し；そして

(c) 各Z'サブユニットは、独立して、中性のアラルキル側鎖を有する α -アミノ酸を表し；

ここで、そのペプチドは、 $(X'Y'X')_p$ 、 $(X'Y')_m$ 、 $(X')_m$ および $(X'Z'Z')_p$ のうちの1つによって表される配列を含み、ここで、pは、2～5であり、mは、2～9である。ある特定の実施形態は、 $(X'Y'X')_p$ 、 $(X'Y')_m$ 、 $(X')_m$ および/または $(X'Z'Z')_p$ から独立して選択される様々な組み合わせ(例えば、配列 $(X'Y'X')(X'Z'Z')(X'Y'X')(X'Z'Z')$ (配列番号129)を有するペプチドを含む)を含む。

【0169】

選択された実施形態において、各X'について、側鎖部分は、アミノ酸サブユニットアルギニン(Arg)におけるようなグアニジルである。さらなる実施形態において、各Y'は、 $-CO-(CH_2)_n-CHR-NH-$ であり、ここで、nは、2～7であり、Rは、Hである。例えば、nが5であり、かつRがHであるとき、Y'は、Ahxと本明細書中で省略される6-アミノヘキサン酸サブユニットであり；nが2であり、かつRがHであるとき、Y'は、Bと本明細書中で省略される β -アラニンサブユニットである。ある特定の実施形態は、種々の中性のアミノ酸の組み合わせを有するキャリアペプチド(例えば、 β -アラニンと6-アミノヘキサン酸の両方を含む配列 $-RAhxxRRBRRAhxxRRBRRAhxB-$ (配列番号124)を含むペプチドを含む)に関する。

【0170】

このタイプの好ましいペプチドは、単一のY'サブユニット(ここで、Y'は好ましくはAhxである)と交互に現れるアルギニンダイマーを含むペプチドを含む。例としては、式 $(RY'R)_p$ または式 $(RRY')_p$ を有するペプチドが挙げられ、ここで、Y'は、好ましくはAhxである。1つの実施形態において、Y'は、6-アミノヘキサン酸サブユニットであり、Rは、アルギニンであり、pは、4である。

【0171】

ある特定の実施形態は、 $(RY'R)_p$ および $(RRY')_p$ のうちの少なくとも2つの様々な直鎖状の組み合わせを含み、その組み合わせとしては、例えば、配列 $(RY'R)(RRY')(RY'R)(RRY')$ (配列番号130)または $(RRY')(RY'R)(RRY')(RY'R)$ (配列番号131)を有する例証的なペプチドが挙げられる。他の組み合わせも企図される。さらなる例証的な実施形態では、各Z'は、フェニルアラニンであり、mは、3または4である。

【0172】

10

20

30

40

50

結合体化されたペプチドは、好ましくは、リンカーA h x-Bを介してオリゴマーの末端に連結され、ここで、A h xは、例えば図1 Cに示されるような、6-アミノヘキサン酸サブユニットであり、Bは、β-アラニンサブユニットである。ペプチドとオリゴマーとの間の代替のリンカーとしては、グリシンおよびシステインが挙げられる。これらのリンカーおよび関連するリンカーは、アミド結合またはジスルフィド結合を介して結合体化され得る。

【0173】

選択された実施形態において、各X'について、側鎖部分は、独立して、グアニジル(HN=C(NH₂)NH-)、アミジニル(HN=C(NH₂)C<)、2-アミノジヒドロピリミジル、2-アミノテトラヒドロピリミジル、2-アミノピリジニルおよび2-アミノピリミドニルからなる群から選択され、好ましくは、グアニジルおよびアミジニルから選択される。1つの実施形態において、側鎖部分は、アミノ酸サブユニットアルギニン(Arg)におけるようなグアニジルである。

10

【0174】

ある特定の実施形態において、Y'サブユニットは、Y'サブユニット間に介在するX'サブユニットがないという点で連続していてもよいし、X'サブユニット間に1つずつ散在していてもよい。ある特定の実施形態において、連結サブユニットは、Y'サブユニット間に存在し得る。1つの実施形態において、Y'サブユニットは、トランスポーターの末端に存在する；他の実施形態において、それらのY'サブユニットは、X'サブユニットによって隣接されている。さらに好ましい実施形態において、各Y'は、-CO-(CH₂)_n-CHR-NH-であり、ここで、nは、2~7であり、Rは、Hである。例えば、nが5であり、RがHであるとき、Y'は、A h xと本明細書中で省略される6-アミノヘキサン酸サブユニットである。

20

【0175】

この基の選択される実施形態において、各X'は、アルギニンサブユニットにおけるようなグアニジル側鎖部分を含む。このタイプの好ましいペプチドは、単一のY'サブユニット(ここで、Y'は好ましくはA h xである)と交互に現れるアルギニンダイマーを含むペプチドを含む。例としては、式(RY'R)₄(配列番号132)または式(RRY')₄(配列番号133)を有するペプチドが挙げられ、ここで、Y'は、好ましくはA h xである。後者の場合、核酸アナログは、例えば、図1 Cに示されるように、好ましくはC末端において、好ましくは末端のY'サブユニットに連結される。1つの例示的なリンカーは、構造A h x Bであり、ここで、A h xは、6-アミノヘキサン酸サブユニットであり、Bは、β-アラニンサブユニットである。代替のリンカーとしては、システインおよびグリシンが挙げられる。

30

【0176】

本明細書中に記載されるような輸送部分は、付着された輸送部分の非存在下でのオリゴマーの取り込み、および疎水性サブユニットY'を欠く付着された輸送部分による取り込みと比べて、付着されたオリゴマーの細胞への侵入を大きく増大させると示されている。そのような取り込みの増大は、好ましくは、疎水性サブユニットY'を欠く付着された輸送部分による化合物の取り込みと比べて、哺乳動物細胞内へのその物質の取り込みの少なくとも2倍の増加、好ましくは、4倍の増加によって証明される。取り込みは、好ましくは、結合体化されていない化合物と比べて、少なくとも20倍、より好ましくは、40倍増大される。

40

【0177】

輸送部分のさらなる利点は、おそらく、正に帯電した輸送部分と負に帯電した核酸との間の静電相互作用のおかげで、アンチセンス化合物とその標的核酸配列との間の二重鎖を安定化することが可能であると予想される点である。トランスポーター内の荷電サブユニットの数は、上で述べたように14未満であり、好ましくは、8~11である。

【0178】

アルギニンリッチペプチドトランスポーター(すなわち、細胞透過性ペプチド)の使用

50

は、本発明のある特定の実施形態を実施する際に特に有用である。ある特定のペプチドトランスポーターは、造血細胞および筋細胞を含む一次細胞（primary cell）へのアンチセンス化合物の送達において高度に有効であると示されている（Marshall, Odaら、2007；Jearawiriyapaisarn, Moultonら、2008；Wu, Moultonら、2008）。さらに、他の公知のペプチドトランスポーター（例えば、PenetrationおよびTatペプチド）と比べて、本明細書中に記載されるペプチドトランスポーターは、アンチセンスPMOと結合体化されるとき、いくつかの遺伝子転写物のスプライシングを変更する能力の増大を示す（Marshall, Odaら、2007）。これらの研究における例示的なペプチドとしては、P007（配列番号118）、CP04057（配列番号123）およびCP06062（配列番号124）が挙げられる。

10

【0179】

リンカー（B、AhxB、CまたはG）を含む例示的なペプチドトランスポーターは、下記の表5に与えられる。ある特定の実施形態において、表5に列挙される例示的なペプチドトランスポーターは、ジスルフィド結合またはアミド結合を介してPMOに結合体化され得る。

表5. 例示的なペプチドトランスポーター

【0180】

【表5-1】

ペプチド	配列(N末端からC末端)	配列番号
rTAT	RRRQRRKKRC	115
R ₉ F ₂ C	RRRRRRRRRFFC	116
R ₅ F ₂ R ₄ C	RRRRRFFRRRC	117
(RAh _x R) ₄ AhxB; (P007)	RAh _x RAh _x RAh _x RAh _x RAhxB	118

20

【0181】

【表5-2】

R ₈ C	RRRRRRRRRC	119
R ₉ C	RRRRRRRRRC	120
R ₈ G	RRRRRRRRRG	121
R ₉ G	RRRRRRRRRG	122
(RAh _x R) ₅ AhxB (CP04057)	RAh _x RAh _x RAh _x RAh _x RAh _x RAhxB	123
(RAh _x RRBR) ₂ AhxB; (CP06062)	RAh _x RRBRRAh _x RRBRRAh _x B	124
(RAR) ₄ F ₂ C	RARRARRARRRFFC	125
(RGR) ₄ F ₂ C	RGRRGRRGRRGRFFC	126
R ₉ F ₂ G	RRRRRRRRRFFG	127
R ₉ F ₂ XB	RRRRRRRRRFFAhxB	128

30

40

50

RNA干渉物質

本明細書中に記載されるインフルエンザ標的領域（例えば、M1、M2；配列番号1～11）は、種々のRNA干渉に基づく方法によっても標的にされ得る。RNA干渉（RNAi）は、そもそも、線虫*Caenorhabditis elegans*の研究において発見された進化的に保存された遺伝子サイレンシング機構である（Leeら、*Cell* 75:843, 1993; Reinhardtら、*Nature* 403:901, 2000）。RNAiは、適切な分子機構を発現している細胞内にdsRNAを導入することによって引き起こされ得、次いで、そのdsRNAが、対応する内因性のmRNAを分解する。この機構は、dsRNAから短いRNA（リボヌクレアーゼを相同のmRNA標的に導く）への変換を含む（例えば、Ruvkun, *Science* 2294:797, 2001によって要約されている）。

10

【0182】

ある特定の実施形態において、本明細書中に提供される方法は、M1またはM2タンパク質の発現を干渉することなどによって、インフルエンザウイルスの複製を減少させるために、二本鎖リボ核酸（dsRNA）分子を調節物質として利用し得る。dsRNAは、一般に、2本の一本鎖を含む。dsRNAの一方の鎖は、標的遺伝子または標的領域（「センス」鎖）の一部と実質的に同一のヌクレオチド配列を含み、他方の鎖（「相補」鎖または「アンチセンス」鎖）は、標的領域の一部と実質的に相補的な配列を含む。それらの鎖は、ハイブリダイズして二重鎖構造を形成するのに十分相補的である。ある特定の実施形態において、それらの相補的なRNA鎖は、30ヌクレオチド長未満、25ヌクレオチド長未満、または19～24ヌクレオチド長であり得る。ある特定の態様において、相補的なヌクレオチド配列は、20～23ヌクレオチド長、または22ヌクレオチド長であり得る。

20

【0183】

ある特定の実施形態において、RNA鎖の少なくとも一方は、1～4ヌクレオチド長のヌクレオチドオーバーハングを含む。他の実施形態において、dsRNAは、少なくとも1つの化学的に改変されたヌクレオチドをさらに含み得る。ある特定の態様において、1～4ヌクレオチドの一本鎖オーバーハングを含むdsRNAは、末端のヌクレオチド対に直接隣接する一本鎖オーバーハングの対になっていないヌクレオチドがプリン塩基を含む分子を含み得る。他の態様において、dsRNAの両端における最後の相補的なヌクレオチド対は、G-C対であるか、または最後の4つの末端ヌクレオチド対の少なくとも2つは、G-C対である。

30

【0184】

ある特定の本発明の実施形態は、マイクロRNAを含み得る。マイクロRNAは、生物内において天然に生成される低分子RNAの大集団であり、その一部は、標的遺伝子の発現を制御する。マイクロRNAは、Dicerによって約70ヌクレオチドの一本鎖ヘアピン前駆体転写物から形成される（V. Ambrosら、*Current Biology* 13:807, 2003）。マイクロRNAは、タンパク質に翻訳されないが、その代わりに、特異的なメッセンジャーRNAに結合し、それにより、翻訳を阻止する。マイクロRNAは、その標的と不正確に塩基対形成することにより、翻訳を阻害すると考えられている。ある特定のマイクロRNAは、ヘアピンRNA前駆体として転写され得、次いでそれは、Dicer酵素によって成熟型にプロセッシングされ得る。

40

【0185】

ある特定の実施形態において、上記調節物質、すなわちRNAiオリゴヌクレオチドは、一本鎖である。他の実施形態において、その調節物質、すなわちRNAiオリゴヌクレオチドは、二本鎖である。ある特定の実施形態は、低分子干渉RNA（siRNA）も使用し得る。ある特定の実施形態において、二本鎖オリゴヌクレオチドの第1鎖は、第2鎖よりも2ヌクレオチド残基多く含む。他の実施形態において、第1鎖および第2鎖は、同じ数のヌクレオチドを有する；しかしながら、第1鎖および第2鎖は、第1鎖上および第2鎖上の2つの末端のヌクレオチドが、相補鎖（complementary strand）

50

nd) 上の残基と対を形成しないように食い違っている。ある特定の場合において、その対形成しない2つのヌクレオシドは、チミジン残基 (resides) である。

【0186】

上記調節物質が siRNA を含む場合、その物質は、標的領域と十分に相溶性である領域を含むべきであり、かつ、siRNA 物質またはそのフラグメントが標的 RNA のダウンレギュレーションを媒介し得るようにヌクレオチドに関して十分な長さであるべきである。用語「リボヌクレオチド」または「ヌクレオチド」は、改変された RNA またはヌクレオチド代理物の場合、1つ以上の位置における改変されたヌクレオチドまたは代理物置換部分のことも指し得ることが理解されるだろう。したがって、siRNA 物質は、標的 RNA と少なくとも部分的に相補的な領域であるか、またはそのような領域を含む。siRNA 物質と標的との間に完璧な相補性が存在する必要はないが、その対応は、siRNA 物質またはその切断産物が、標的 RNA の RNAi 切断などによる配列特異的サイレンシングを指示するのを可能にするのに十分でなければならない。標的鎖との相補性、すなわち相溶性の程度は、アンチセンス鎖において最も重大である。特にアンチセンス鎖において完璧な相補性が望まれることが多いが、いくつかの実施形態は、標的 RNA に対して1つ以上であるが、好ましくは、10、8、6、5、4、3、2個またはそれより少ない mismatches を含む。それらの mismatches は、末端の領域において最も許容され、存在する場合、好ましくは、末端の領域、例えば、5' および/または 3' 末端の 6、5、4 または 3 ヌクレオチド以内に存在する。センス鎖は、その分子の全体的な二本鎖の特性を維持するためにアンチセンス鎖と十分に相補的であることだけが必要である。

【0187】

さらに、siRNA 調節物質は、改変され得るか、またはヌクレオシド代理物を含み得る。siRNA 物質の一本鎖領域は、改変され得るかまたはヌクレオシド代理物を含み得、例えば、対になっていない領域またはヘアピン構造の領域、例えば、2つの相補的な領域を連結する領域が、改変またはヌクレオシド代理物を有し得る。例えばエキソヌクレアーゼに対して siRNA 物質の1つ以上の 3' 末端または 5' 末端を安定化する改変、またはアンチセンス siRNA 物質が RISC 内に入るのを促す改変もまた、有用である。改変としては、C3 (または C6、C7、C12) アミノリンカー、チオールリンカー、カルボキシルリンカー、非ヌクレオチドスパーサー (C3、C6、C9、C12、無塩基、トリエチレングリコール、ヘキサエチレングリコール)、ホスホルアミダイトを与え、かつ別の DMT 保護ヒドロキシル基を有し、RNA 合成中に複数の結合を可能にする、特殊なピオチンまたはフルオレセイン試薬が挙げられ得る。

【0188】

siRNA 物質は、インターフェロン応答を引き起こさない十分短い分子 (Dicer によって切断され得かつ/または RISC (RNAi 誘導サイレンシング複合体) に入り得る分子)、例えば、RISC に入るのを可能にするサイズである分子、例えば、Dicer 切断産物に似ている分子に加えて、例えば、インターフェロン応答を引き起こすほど長い分子 (Dicer によって切断され得 (Bernstein ら、Nature, 409: 363-366, 2001) かつ RISC に入り得る、分子) を含み得る。インターフェロン応答を引き起こさない程度に十分短い分子は、本明細書中で siRNA 物質またはより短い RNAi 物質と呼ばれる。使用される「siRNA 物質またはより短い RNAi 物質」とは、ヒト細胞において有害なインターフェロン応答を誘導しない程度に十分短い siRNA 物質のことを指し、例えば、それは、60 ヌクレオチド対未満であるが、好ましくは、50、40 または 30 ヌクレオチド対未満の二重鎖の領域を有する。siRNA 調節物質またはその切断産物は、例えば、標的 RNA、好ましくは、M1 または M2 などのインフルエンザ標的 RNA に対する RNAi を誘導することによって、標的遺伝子をダウンレギュレートし得る。

【0189】

siRNA 調節物質の各鎖は、35、30、25、24、23、22、21 または 20 ヌクレオチド長以下であり得る。その鎖は、好ましくは、少なくとも 19 ヌクレオチド

長である。例えば、各鎖は、21～25ヌクレオチド長であり得る。好ましい siRNA 物質は、17、18、19、29、21、22、23、24または25ヌクレオチド対の二重鎖領域、および1つ以上のオーバーハング、好ましくは、2～3ヌクレオチドの1つまたは2つの3'オーバーハングを有する。

【0190】

標的RNAに対する相同性および標的遺伝子をダウンレギュレートする能力に加えて、siRNA調節物質は、以下の特性のうちの1つ以上を有し得る：siRNA調節物質は、そのヌクレオシドの非常に多数またはすべてに対する改変にもかかわらず、正しい塩基対を形成することができるように、および例えば、標的RNAの切断による、標的のダウンレギュレーションを可能にするのに十分相同な標的RNAと二重鎖構造を形成することができるように、適切な3次元フレームワークにおいて塩基（または改変された塩基）をもたらし得るアンチセンス鎖を有し得る；siRNA調節物質は、そのヌクレオシドの非常に多数またはすべてに対する改変にもかかわらず、なおも「RNA様」の特性を有し得る、すなわち、それは、リボヌクレオチドベースの内容物のRNA分子の全体としての構造的、化学的および物理的な特性を（専らではないにしても、部分的にさえ）有し得る。例えば、siRNA物質は、ヌクレオチド糖のすべてが、例えば、2'ヒドロキシルの代わりに2'フルオロを含む、例えば、センス鎖および／またはアンチセンス鎖を含み得る。このデオキシリボヌクレオチド含有物質は、なおもRNA様特性を示すと予想され得る。理論に拘束されることを望むものではないが、電気陰性フッ素は、リボースのC2'位に付着されたとき、軸方向の配向を好む。そして、このフッ素の空間的な好みによって、糖はC₃'-エンドパッカー（endo pucker）の形を取らざるを得なくなり得る。これは、RNA分子において観察されるのと同じパッカリング様式であり、RNAに特徴的なAファミリー型らせんを生じる。さらに、フッ素は、好適な水素結合アクセプターであるので、フッ素は、RNA構造を安定化させると知られている水分子と同じ水素結合相互作用に関与し得る。一般に、2'糖の位置における改変された部分が、デオキシリボヌクレオチドのH部分よりもリボヌクレオチドのOH部分により特徴的な水素結合に入ることができることが好ましい。

【0191】

本明細書中で使用されるとき、「一本鎖RNA i物質」は、単一分子で構成されるRNA i物質である。一本鎖RNA i物質は、鎖内の対形成によって形成される二重鎖の領域を含み得、例えば、ヘアピン構造もしくはパンハンドル（pan-handle）構造であり得るか、またはそれらを含み得る。一本鎖RNA i調節物質は、好ましくは、標的分子に対してアンチセンスである。一本鎖RNA i物質は、RISCに入り、RISC媒介性の標的mRNA切断に関与し得るのに十分に長くあるべきである。一本鎖RNA i物質は、少なくとも14ヌクレオチド長、より好ましくは、少なくとも15、20、25、29、35、40または50ヌクレオチド長である。一本鎖RNA i物質は、好ましくは、200、100または60ヌクレオチド長未満である。

【0192】

ヘアピンRNA i調節物質は、少なくとも17、18、19、29、21、22、23、24もしくは25ヌクレオチド対であるかまたはそれらに等しい二重鎖領域を有し得る。その二重鎖領域は、好ましくは、200、100または50ヌクレオチド対の長さ以下であり得る。二重鎖領域に対するある特定の範囲は、15～30、17～23、19～23および19～21ヌクレオチド対の長さである。ヘアピンは、一本鎖オーバーハング、または末端の対になっていない領域、好ましくは、そのヘアピンの3'、好ましくは、そのアンチセンス側の3'の対になっていない領域を有し得る。ある特定の実施形態において、オーバーハングは、2～3ヌクレオチド長である。

【0193】

本明細書中に提供される方法に従って利用されるある特定の調節物質は、RNA iオリゴヌクレオチド（例えば、キメラオリゴヌクレオチド、すなわち、2つ以上の化学的に異なる領域を含み、その各々が少なくとも1つのモノマー単位（すなわち、オリゴヌクレオ

チド化合物の場合のヌクレオチド)で構成されている「キメラ」)を含み得る。これらのオリゴヌクレオチドは、代表的には、少なくとも1つの領域を含み、ここで、そのオリゴヌクレオチドは、ヌクレアーゼ分解に対する高い抵抗性、高い細胞取り込みおよび/または標的核酸に対する高い結合親和性をオリゴヌクレオチドに付与するように、改変されている。その結果として、キメラオリゴヌクレオチドを使用したより短いオリゴヌクレオチドを用いるとき、ホスホロチオエートオリゴデオキシヌクレオチドと比べて、同等の結果を得ることができることが多い。キメラオリゴヌクレオチドは、上に記載されたように、2つ以上のオリゴヌクレオチド、改変されたオリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチドおよび/またはオリゴヌクレオチド模倣物の複合構造として形成され得る。そのようなオリゴヌクレオチドは、当該分野においてハイブリッドまたはギャップマー (gapmers) とも呼ばれている。そのようなハイブリッド構造の調製を教示している代表的な米国特許としては、米国特許第5,013,830号、同第5,149,797号、同第5,220,007号、同第5,256,775号、同第5,366,878号、同第5,403,711号、同第5,491,133号、同第5,565,350号、同第5,623,065号、同第5,652,355号、同第5,652,356号、同第5,700,922号および同第5,955,589号(これらの各々が本明細書中で参考として援用される)が挙げられるが、これらに限定されない。ある特定の実施形態において、キメラオリゴヌクレオチドは、RNA-DNA、DNA-RNA、RNA-DNA-RNA、DNA-RNA-DNAまたはRNA-DNA-RNA-DNAであり、ここで、そのオリゴヌクレオチドは、5~60ヌクレオチド長である。

【0194】

本発明の1つの態様において、RNAi物質などの調節物質は、変更された核酸塩基または非天然の核酸塩基に繋ぎ止められた少なくとも1つのリガンドを含むオリゴヌクレオチドに関する。多数の化合物が、変更された塩基として機能し得る。変更された塩基の構造は、オリゴヌクレオチドがその標的(例えば、mRNA)に結合するのをその変更された塩基が実質的に妨害しないであろう範囲において重要である。ある特定の実施形態において、変更された塩基は、ジフルオロトリル、ニトロピロリル、ニトロイミダゾリル、ニトロインドリル、ナフタレニル(naphthalenyl)、アントラセニル(anthracenyl)、ピリジニル、キノリニル、ピレニル、または本明細書中に記載される非天然核酸塩基のうちのいずれか1つの二価のラジカルである。ある特定の実施形態において、非天然核酸塩基は、ジフルオロトリル、ニトロピロリルまたはニトロイミダゾリルである。ある特定の実施形態において、非天然核酸塩基は、ジフルオロトリルである。多種多様のリガンドが、当該分野で公知であり、本発明に適している。例えば、リガンドは、ステロイド、胆汁酸、脂質、葉酸、ピリドキサル、B12、リボフラビン、ビオチン、芳香族化合物、多環式化合物、クラウンエーテル、インターカレーター、切断分子(cleaver molecule)、タンパク質結合物質または炭水化物であり得る。ある特定の実施形態において、リガンドは、ステロイドまたは芳香族化合物である。ある特定の場合において、リガンドは、コレステリルである。

【0195】

他の実施形態において、RNAi物質は、細胞標的化および細胞取り込みを改善する目的でリガンドに繋ぎ止められたオリゴヌクレオチドである。例えば、RNAi物質は、抗体またはその抗原結合フラグメントに繋ぎ止められ得る。追加の例として、RNAi物質は、特異的なリガンド結合分子(例えば、特定の細胞表面レセプターに特異的に結合するポリペプチドまたはポリペプチドフラグメント)に繋ぎ止められ得る。

【0196】

他の実施形態において、調節物質は、非天然核酸塩基を含む。ある特定の実施形態において、その非天然核酸塩基は、ジフルオロトリル、ニトロイミダゾリル、ニトロインドリルまたはニトロピロリルである。ある特定の実施形態において、本明細書中に提供される調節物質は、2本の鎖のうちの1本だけが非天然核酸塩基を含む二本鎖オリゴヌクレオチド配列に関する。ある特定の実施形態において、本明細書中で使用される調節物質は、両

方の鎖が独立して少なくとも1つの非天然核酸塩基を含む二本鎖オリゴヌクレオチド配列に関する。

【0197】

ある特定の場合において、ヌクレオシド中に天然に存在するリボース糖部分は、ヘキソース糖で置き換えられる。ある特定の態様において、そのヘキソース糖は、アロース、アルトロース、グルコース、マンノース、グロース、イドース、ガラクトース、タロースまたはそれらの誘導体である。好ましい実施形態において、ヘキソースは、D-ヘキソースである。ある特定の場合において、ヌクレオシド中に天然に存在するリボース糖部分は、多環式のヘテロアルキル環またはシクロヘキセニル基で置き換えられる。ある特定の場合において、多環式のヘテロアルキル基は、その環に1つの酸素原子を含む二環式の環である。ある特定の場合において、多環式のヘテロアルキル基は、ビシクロ[2. 2. 1]ヘプタン、ビシクロ[3. 2. 1]オクタンまたはビシクロ[3. 3. 1]ノナンである。ある特定の実施形態において、オリゴヌクレオチドの骨格は、そのオリゴヌクレオチド化合物の治療的特性または診断的特性を改善するように改変されている。ある特定の実施形態において、そのオリゴヌクレオチドの塩基の少なくとも1つまたは糖の少なくとも1つが、そのオリゴヌクレオチド化合物の治療的特性または診断的特性を改善するように改変されている。オリゴヌクレオチドが二本鎖である場合、その2本の鎖は、相補的であるか、部分的に相補的であるか、またはキメラオリゴヌクレオチドである。

【0198】

本発明の方法において使用するために想定されている改変されたRNA物質の例としては、改変された骨格または非天然のヌクレオシド間結合を含むオリゴヌクレオチドが挙げられる。本明細書中で定義されるように、改変された骨格またはヌクレオシド間結合を有するオリゴヌクレオチドには、骨格中にリン原子を保持するオリゴヌクレオチドおよび骨格中にリン原子を有しないオリゴヌクレオチドが含まれる。糖間(inter-sugar)骨格中にリン原子を有しない改変されたオリゴヌクレオチドもまた、オリゴヌクレオチドであると考えられ得る。特定のオリゴヌクレオチド化学的改変が下に記載される。所与の化合物中のすべての位置が均一に改変される必要はなく、実際に、下記の改変の2つ以上が、単一のオリゴヌクレオチド化合物中に、またはその単一のヌクレオチド中にさえ、組み込まれ得る。

【0199】

改変されたヌクレオシド間結合または改変された骨格の例としては、例えば、通常の3'-5'結合を有する、ホスホロチオエート、キラルホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホトリエステル、アミノアルキルホスホトリエステル、メチルおよび他のアルキルのホスホネート(3'-アルキレンホスホネートおよびキラルホスホネートを含む)、ホスフィネート、ホスホルアミデート(3'-アミノホスホルアミデートおよびアミノアルキルホスホルアミデートを含む)、チオホスホルアミデート、チオノアルキルホスホネート、チオノアルキルホスホトリエステル(thionoalklylphosphotriester)およびボラノホスフェート、これらの2'-5'連結型のアナログ、ならびに逆の極性を有するもの(隣接するヌクレオシド単位の対が、3'-5'と5'-3'または2'-5'と5'-2'とで連結している)が挙げられる。様々な塩、混合塩および遊離酸の形態もまた含まれる。

【0200】

上記のリン原子含有結合の調製を教示している代表的な米国特許としては、米国特許第3, 687, 808号、同第4, 469, 863号、同第4, 476, 301号、同第5, 023, 243号、同第5, 177, 196号、同第5, 188, 897号、同第5, 264, 423号、同第5, 276, 019号、同第5, 278, 302号、同第5, 286, 717号、同第5, 321, 131号、同第5, 399, 676号、同第5, 405, 939号、同第5, 453, 496号、同第5, 455, 233号、同第5, 466, 677号、同第5, 476, 925号、同第5, 519, 126号、同第5, 536, 821号、同第5, 541, 306号、同第5, 550, 111号、同第5, 563, 2

53号、同第5, 571, 799号、同第5, 587, 361号、同第5, 625, 050号および同第5, 697, 248号（これらの各々が、本明細書中で参考として援用される）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0201】

改変されたヌクレオシド間結合、またはその中にリン原子を含まない骨格（すなわち、オリゴヌクレオチド）の例は、短鎖アルキルもしくはシクロアルキル糖間結合、ヘテロ原子糖間結合とアルキルまたはシクロアルキル糖間結合とが混合されたもの、または1つ以上の短鎖ヘテロ原子糖間結合もしくは複素環式糖間結合によって形成される骨格を有する。これらには、モルホリノ結合（ヌクレオシドの糖部分から部分的に形成される）を有するもの；シロキサン骨格；スルフィド骨格、スルホキシド骨格およびスルホン骨格；ホルムアセチル骨格およびチオホルムアセチル骨格；メチレンホルムアセチル骨格およびチオホルムアセチル骨格；アルケン含有骨格；スルファメート骨格；メチレンイミノ骨格およびメチレンヒドラジノ骨格；スルホネート骨格およびスルホンアミド骨格；アミド骨格；ならびにN、O、SおよびCH₂の構成部分が混合されたものを有するその他のものが含まれる。

【0202】

上記のオリゴヌクレオチドの調製を教示している代表的な米国特許としては、米国特許第5, 034, 506号、同第5, 166, 315号、同第5, 185, 444号、同第5, 214, 134号、同第5, 216, 141号、同第5, 235, 033号、同第5, 264, 562号、同第5, 264, 564号、同第5, 405, 938号、同第5, 434, 257号、同第5, 466, 677号、同第5, 470, 967号、同第5, 489, 677号、同第5, 541, 307号、同第5, 561, 225号、同第5, 596, 086号、同第5, 602, 240号、同第5, 610, 289号、同第5, 602, 240号、同第5, 608, 046号、同第5, 610, 289号、同第5, 618, 704号、同第5, 623, 070号、同第5, 663, 312号、同第5, 633, 360号、同第5, 677, 437号および同第5, 677, 439号（これらの各々が、本明細書中で参考として援用される）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0203】

オリゴヌクレオチド模倣物の他の例において、ヌクレオシド単位の糖とヌクレオシド間結合（すなわち骨格）の両方が、新規の基で置き換えられ得る。その核酸塩基単位は、適切な核酸標的化合物とのハイブリダイゼーションのために維持される。そのようなオリゴヌクレオチドの1つである、優れたハイブリダイゼーション特性を有すると示されているオリゴヌクレオチド模倣物は、ペプチド核酸（PNA）と呼ばれる。PNA化合物において、オリゴヌクレオチドの糖骨格は、アミド含有骨格、特に、アミノエチルグリシン骨格で置き換えられている。その核酸塩基は、その骨格のアミド部分の原子に直接または間接的に保持され、結合される。PNA化合物の調製を教示している代表的な米国特許としては、米国特許第5, 539, 082号、同第5, 714, 331号および同第5, 719, 262号（これらの各々が、本明細書中で参考として援用される）が挙げられるが、これらに限定されない。PNA化合物に関するさらなる教示は、N i e l s e n ら、S c i e n c e, 1991, 254, 1497に見られ得る。

【0204】

本発明はさらに、リボザイムを利用するオリゴヌクレオチドを包含する。高度に特異的なエンドリボヌクレアーゼ活性を触媒する合成RNA分子およびその誘導体は、リボザイムとして公知である（一般に、H a s e l o f f らに対する米国特許第5, 543, 508号およびG o o d c h i l d らに対する米国特許第5, 545, 729号を参照のこと）。その切断反応は、RNA分子自体によって触媒される。天然に存在するRNA分子において、自己触媒される切断の部位は、RNA二次構造の高度に保存された領域内に位置している（B u z a y a n ら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U . S . A . 83:8859-62, 1986; F o r s t e r ら、C e l l . 50:9-16, 1987）。天然に存在する自己触媒RNA分子は、高い特異性の程度で特定の細胞のRNA分

子または特定の病原体のRNA分子を標的にし得るリボザイムを生成するように改変されてきた。したがって、リボザイムは、アンチセンスオリゴヌクレオチドと同じ通常の目的（すなわち、特異的な遺伝子の発現の調節）に適合し、そしてオリゴヌクレオチドと同様に、一本鎖の部分はかなり有する核酸である。

【0205】

ある特定の場合において、本明細書中に提供される方法とともに使用するためのRNAi物質は、非リガンド基によって改変され得る。オリゴヌクレオチドの活性、細胞分布、細胞標的化または細胞取り込みを増大させるために、いくつかの非リガンド分子が、オリゴヌクレオチドに結合体化されており、そのような結合体化を行うための手順は、科学文献において入手可能である。そのような非リガンド部分は、脂質部分、例えば、コレステロール（Lettingerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:6553-56, 1989）、コール酸（Manoharanら、Bioorg. Med. Chem. Lett. 4:1053, 1994）、チオエーテル、例えば、ヘキシル-5-トリチルチオール（Manoharanら、Ann. N. Y. Acad. Sci., 660:306, 1992; Manoharanら、Bioorg. Med. Chem. Lett., 3:2765, 1993）、チオコレステロール（Oberhauserら、Nucl. Acids Res., 20:533, 1992）、脂肪族鎖、例えば、ドデカンジオール残基またはウンデシル残基（Saison-Behmoarasら、EMBO J. 10:111, 1991; Kabanovら、FEBS Lett. 259:327, 1990; Svinarchukら、Biochimie. 75:49, 1993）、リン脂質、例えば、ジ-ヘキサデシル-*rac*-グリセロールもしくはトリエチルアンモニウム1, 2-ジ-*O*-ヘキサデシル-*rac*-グリセロール-3-*H*-ホスホネート（Manoharanら、Tetrahedron Lett., 36:3651, 1995; Sheaら、Nucl. Acids Res. 18:3777, 1990）、ポリアミンもしくはポリエチレングリコール鎖（Manoharanら、Nucleosides & Nucleotides. 14:969, 1995）またはアダマンタン酢酸（Manoharanら、Tetrahedron Lett. 36:3651, 1995）、パルミチル部分（Mishraら、Biochim. Biophys. Acta. 1264:229, 1995）、あるいはオクタデシルアミンまたはヘキシルアミノ-カルボニル-オキシコレステロール部分（Crookeら、J. Pharmacol. Exp. Ther. 277:923, 1996）を含んでいる。そのようなオリゴヌクレオチド結合体の調製を教示している代表的な米国特許は、上に列挙されている。代表的な結合体化プロトコルは、配列の1つ以上の位置にアミノリンカーを有するオリゴヌクレオチドの合成を含む。次いで、そのアミノ基は、適切なカップリング試薬または活性化試薬を用いて、結合体化される分子と反応される。その結合体化反応は、オリゴヌクレオチドが固体支持体に結合したままで、または溶液相においてオリゴヌクレオチドを切断した後に、行われ得る。代表的には、HPLCによるオリゴヌクレオチド結合体の精製によって、純粋な結合体がもたらされる。

【0206】

RNAiオリゴヌクレオチドなどの調節物質の追加の例は、米国出願公開番号2007/0275465、2007/0054279、2006/0287260、2006/0035254、2006/0008822（これらは参考として援用される）に見られ得る。

【0207】

インフルエンザウイルスの複製の阻害

上で詳述されたアンチセンス化合物は、Orthomyxoviridae科の一本鎖マイナスセンス分節型RNAウイルスの複製を阻害する際に有用である。1つの実施形態において、そのような阻害は、これらのウイルスによる宿主動物の感染を処置する際に有効である。したがって、本方法は、1つの実施形態において、特定のウイルスの複製を阻害するのに有効なアンチセンス物質と、そのウイルスに感染した細胞とを接触させる工程

を包含する。この実施形態において、そのアンチセンス物質は、適当な薬学的キャリア中において、所与のウイルスに感染した哺乳動物被験体、例えば、ヒトまたは飼育されている動物に投与される。そのアンチセンスオリゴヌクレオチドは、宿主内でRNAウイルスの増殖を停止すると企図される。宿主の正常な成長または発生に対して有害な影響がほとんどまたはまったくなく、そのRNAウイルスは、数が減少し得るか、または排除され得る。

【0208】

実施例に記載されるような本発明では、インフルエンザAウイルスのM1/M2遺伝子セグメント（すなわち、セグメント7）にハイブリダイズするように設計されたホスホロジアミデートモルホリノオリゴマー（PMO）を、そのインフルエンザウイルス産生を阻害する能力について2つの動物モデルにおいて評価した。それらのPMOは、細胞内への侵入を促進する短いアルギニンリッチペプチドに結合体化されたか、またはカチオン性結合を含むPMO plus（商標）化合物として生成された。それらの化合物は、M1マトリックスタンパク質（M1）およびイオンチャネルタンパク質（M2）（この両方が、M1/M2 mRNAの選択的スプライシング型を用いて同じAUG開始コドンから発現される）のAUG翻訳開始部位を標的にした。

【0209】

本発明のM1/M2-AUGを標的にしているアンチセンス化合物は、実施例1に記載されるようなH3N2のマウスモデルにおいてウイルス力価を阻害した。本発明のM1/M2-AUGを標的にしている化合物は、実施例2に記載されるような2009H1N1（S-OIV）汎発性ブタインフルエンザのフェレットモデルにおいて、インフルエンザ感染の臨床的徴候の減少および鼻洗浄液（nasal washes）中のウイルス力価の減少も示した。したがって、本明細書中で例証されるアンチセンスオリゴヌクレオチドおよびRNAi物質は、ウイルス感染、主に、Orthomyxoviridae科の一本鎖マイナスセンス分節型RNAウイルスに起因し得る感染の処置において使用され得る。

【0210】

本発明の実施形態は、併用療法および関連の組成物も含む。例えば、本明細書中に提供される抗ウイルス性（すなわち、ウイルスを標的にしている）アンチセンスオリゴヌクレオチドおよびRNAi物質は、宿主分子を標的にするアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはRNAi物質と組み合わせて使用され得る。この点について、宿主の免疫応答遺伝子および/またはそのレセプターのアンチセンスまたはRNAi標的化は、免疫応答を改善するために使用され得、それにより、ウイルスの感染か細菌の感染（例えば、二次的細菌感染）かに関係なく、その後の感染を予防し得るかまたは減少させ得る。1つの例として、CD200/R-マウスは、インフルエンザ感染後に敗血症を発症しないことが示されている。CD200は、通常は自然免疫反応のダウンレギュレートをもたらす自然免疫反応の負の制御因子である。ゆえに、ある特定の処置方法は、本明細書中に記載されるインフルエンザを標的にするアンチセンス物質のうちのいずれか1つ以上の投与と組み合わせた（同時にまたは別個に）、CD200および/またはCD200レセプターをコードする宿主RNA分子を標的にするアンチセンスおよび/またはRNAi物質の投与（例えば、Hatherlyら、Eur J Immunol. 34:1688-94, 2004を参照のこと）を包含し得る。本明細書中に記載されるようなインフルエンザウイルスを標的にするアンチセンスまたはRNAi物質と組み合わせた、CD200および/またはCD200レセプターを標的にするアンチセンスまたはRNAi物質（例えば、そのAUG開始コドンまたはスプライス部位を標的にするもの）を含む組成物もまた含まれる。これらの方法および組成物は、独立したインフルエンザウイルス感染、および/またはインフルエンザウイルス感染に付随する二次的細菌感染（例えば、連鎖球菌性肺炎）を処置するために使用され得る。

【0211】

本発明の実施形態は、二次的細菌感染に伴うウイルス感染（例えば、インフルエンザ感

10

20

30

40

50

染)を処置するための併用療法も含む。1918～1919年のインフルエンザ大流行における死亡の大部分は、*Streptococcus pneumoniae*などの通常の上気道細菌によって引き起こされる続発性細菌性肺炎に起因したとみられ、2009年のH1N1大流行からの最近の証拠は、二次的細菌感染が未だに重要な死因であることを示唆している(例えば、Louieら、*Clin Infect Disease*. 50: e59-62, 2010; Jainら、*N Engl J Med*. 361: 1935-44, 2009; Jamiesonら、*Cell Host Microbe*. 7: 103-14, 2010を参照のこと)。連鎖球菌性肺炎に対する患者管理標準は、抗生物質を含む。第1の抗生物質としては、ペニシリンおよびアモキシシリンなどの殺菌性のベータラクタム剤が挙げられ、第2選択薬としては、セファロスポリンが挙げられ、第3選択薬としては、クロラムフェニコールまたはクリンダマイシンが挙げられる。したがって、本発明の実施形態は、本明細書中に提供されるインフルエンザを標的にしている1つ以上のアンチセンスまたはRNAi物質と組み合わせた、主に、インフルエンザウイルス感染に付随する二次的細菌感染を処置するためまたは管理する1つ以上の静菌性(bacteriostatic)または殺菌性の抗生物質(例えば、ペニシリン、アモキシシリン、セファロスポリン、クロラムフェニコール、クリンダマイシン)の投与(同時にまたは別個に)に関する方法および組成物を含む。

10

【0212】

別の例として、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドおよびRNAi物質は、インフルエンザウイルスを標的にする他の治療(例えば、リン酸オセルタミビル(TAMIFLU(登録商標))と組み合わせて(同時にまたは別個に)投与され得る。ある特定の態様において、1つ以上のアンチセンスオリゴヌクレオチド(例えば、AVI-7100)とオセルタミビルとの併用は、オセルタミビル単独または抗ウイルス性アンチセンスオリゴヌクレオチド単独の使用と比べて、インフルエンザウイルス力価および/またはインフルエンザウイルス感染の他の症状(例えば、肺炎、浸潤性免疫細胞)の減少において相乗効果をもたらし得る。本明細書中に記載されるようなインフルエンザウイルスを標的にする抗ウイルス性アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはRNAi物質と組み合わせてオセルタミビルを含む組成物もまた含まれる。特定の実施形態において、これらの組成物および方法は、別途オセルタミビル耐性のインフルエンザウイルス感染の処置において使用され得る。

20

30

【0213】

感染性物質の同定

感染を引き起こしている特定のウイルスは、当該分野で公知の方法、例えば、血清学的方法または培養法によって決定され得る。

【0214】

血清学的な同定では、被験体の生物学的検体、例えば、唾液、便、尿、脳脊髄液、血液などから単離されたウイルスサンプルまたはウイルス培養物を使用する。ウイルスを検出するためのイムノアッセイは、一般に、当業者が日常的に使用する方法、例えば、ELISAまたはウエスタンブロットによって行われる。さらに、特定のウイルス株またはウイルス種に特異的なモノクローナル抗体が、商業的に入手可能であることが多い。

40

【0215】

培養法は、様々な培養条件下での増殖速度および形態などの特徴の比較を含むがこれに限定されない手法を使用することによって、特定のタイプのウイルスを単離するためおよび同定するために使用され得る。

【0216】

感染した被験体内のウイルス感染性物質を同定するための別の方法は、生物学的検体からRNAを単離した後に、疑わしいウイルス物質、例えば、季節性H1N1インフルエンザ、汎発性H1N1-S-OIV、H5N1トリインフルエンザまたはH3N2ブタインフルエンザを標的にする特異的PCRプライマーを用いた核酸増幅を使用する。

【0217】

50

製剤化および投与

ある特定の実施形態において、本発明は、本明細書中に記載されるようなアンチセンスオリゴマーの治療上の送達に適した製剤または組成物を提供する。ゆえに、ある特定の実施形態において、本発明は、1つ以上の薬学的に許容され得るキャリア（添加剤）および／または希釈剤とともに製剤化される、本明細書中に記載される治療有効量のオリゴマーの1つ以上を含む薬学的に許容され得る組成物を提供する。本発明のオリゴマーは、単独で投与されることが可能であるが、薬学的製剤（組成物）としてその化合物を投与することが好ましい。

【0218】

核酸分子を送達するための方法は、例えば、Akhtarら、1992, Trends Cell Bio., 2:139; および Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics, ed. Akhtar; Sullivanら、PCT WO94/02595に記載されている。これらおよび他のプロトコルが、本発明の単離されたオリゴマーを含む実質的に任意の核酸分子の送達のために利用され得る。

【0219】

下で詳述されるように、本発明の薬学的組成物は、以下に適合された形態を含む固体または液体の形態で投与するために特別に製剤化され得る：（1）経口投与、例えば、水薬（水性または非水性の溶液または懸濁液）、錠剤、例えば、頬側、舌下および全身での吸収を目標にしている錠剤、ボーラス、散剤、顆粒剤、舌に適用するためのペースト；（2）非経口投与、例えば、滅菌された溶液もしくは懸濁液または徐放製剤としての、例えば、皮下、筋肉内、静脈内または硬膜外注射による投与；（3）例えば、皮膚に適用されるクリーム、軟膏または制御放出パッチもしくはスプレーとしての、局所的適用；（4）例えば、ベッサリー、クリームまたは泡沫としての、腔内または直腸内；（5）舌下；（6）眼；（7）経皮；または（8）経鼻。

【0220】

句「薬学的に許容され得る」は、過剰な毒性、刺激作用、アレルギー反応、または妥当な利益／リスク比に比例した他の問題もしくは合併症なしに、まっとうな医学的判断の範囲内でヒトおよび動物の組織との接触における使用に適した、化合物、材料、組成物および／または剤形のことを指すために本明細書中で使用される。

【0221】

本明細書中で使用されるとき、句「薬学的に許容され得るキャリア」は、薬学的に許容され得る材料、組成物またはビヒクル（例えば、液体または固体の充填剤、希釈剤、賦形剤、製造助剤（manufacturing aid）（例えば、滑沢剤、タルク、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウムもしくはステアリン酸亜鉛またはステアリン酸（stearic acid））、または1つの器官もしくは身体の一部から別の器官もしくは身体の別の部分への主題の化合物の輸送もしくは運搬に関わる溶媒被包材料のことを意味する。各キャリアは、その製剤の他の成分と適合性であり、かつ患者にとって有害でないという意味において、「許容され得」なければならない。

【0222】

薬学的に許容され得るキャリアとして働き得る材料のいくつかの例としては：（1）糖（例えば、ラクトース、グルコースおよびスクロース）；（2）デンプン（例えば、トウモロコシデンプンおよびジャガイモデンプン）；（3）セルロースおよびその誘導体（例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、エチルセルロースおよび酢酸セルロース）；（4）トラガント末；（5）麦芽；（6）ゼラチン；（7）タルク；（8）賦形剤（例えば、カカオバターおよび坐剤用ろう）；（9）油（例えば、ピーナッツ油、綿実油、ベニバナ油、ゴマ油、オリーブ油、トウモロコシ油およびダイズ油）；（10）グリコール（例えば、プロピレングリコール）；（11）ポリオール（例えば、グリセリン、ソルビトール、マンニトールおよびポリエチレングリコール）；（12）エステル（例えば、オレイン酸エチルおよびラウリン酸エチル）；（13）寒天；（14）緩衝剤（例えば

、水酸化マグネシウムおよび水酸化アルミニウム)；(15)アルギン酸；(16)発熱物質非含有水；(17)等張食塩水；(18)リンガー溶液；(19)エチルアルコール；(20)pH緩衝液；(21)ポリエステル、ポリカーボネートおよび／またはポリ無水物；ならびに(22)薬学的製剤において使用される他の無毒性の適合性物質が挙げられるが、これらに限定されない。

【0223】

本発明のアンチセンスオリゴマーを用いた製剤化に適した薬剤の追加の非限定的な例としては：PEG結合体化核酸、リン脂質結合体化核酸、親油性部分を含む核酸、ホスホチオエート、様々な組織内への薬物の侵入を増大させ得るP-糖タンパク質インヒビター（例えば、Pluronic P85）；生分解性ポリマー、例えば、埋め込み後の徐放送達のためのポリ（DL-ラクチド-コグリコリド）ミクロスフェア（Emerich, DFら、Cell Transplant. 8:47-58, 1999）Alkermes, Inc. Cambridge, Mass.；および充填されたナノ粒子、例えば、血液脳関門を越えて薬物を送達し得、かつニューロンの取り込み機構を変化させ得る、ポリブチルシアノアクリレートから生成されたナノ粒子（Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 23, 941-949, 1999）が挙げられる。

【0224】

本発明はまた、ポリ（エチレングリコール）脂質を含む、表面が改変されたりリポソーム（分枝状および非分枝状もしくはそれらの組み合わせのPEGで改変された、または長期循環の（long-circulating）リポソームもしくはステルスリポソーム）を含む組成物の使用も特徴とする。本発明のオリゴマーは、共有結合的に付着された様々な分子量のPEG分子も含み得る。これらの製剤は、標的組織における薬物の蓄積を増加させるための方法を提供する。このクラスの薬物キャリアは、単核食細胞系（MPSまたはRES）によるオプソニン化および排除に抵抗し、それにより、被包された薬物の血液循環時間をより長くし、また、その薬物の組織曝露を増大させる（Lasicら、Chem. Rev. 1995, 95, 2601-2627；Ishiwataら、Chem. Pharm. Bull. 1995, 43, 1005-1011）。そのようなリポソームは、おそらく血管新生した標的組織における血管外遊出および捕捉によって、腫瘍内に選択的に蓄積すると示されている（Lasicら、Science. 267:1275-1276, 1995；Okura、Biochim. Biophys. Acta. 1238:86-90, 1995）。その長期循環リポソームは、特に、MPSの組織内に蓄積すると知られている従来のカチオン性リポソームと比べて、DNAおよびRNAの薬物動態および薬力学を増大させる（Liuら、J. Biol. Chem. 42:24864-24870, 1995；Choiら、国際PCT公開番号WO96/10391；Ansellら、国際PCT公開番号WO96/10390；Hollandら、国際PCT公開番号WO96/10392）。長期循環リポソームは、肝臓および脾臓などの代謝的に活動的なMPS組織における蓄積を回避する能力に基づいて、カチオン性リポソームと比べて大幅にヌクレアーゼ分解から薬物を保護する可能性もある。

【0225】

さらなる実施形態において、本発明は、米国特許第6,692,911号、同第7,163,695号および同第7,070,807号に記載されているような送達のために調製されるオリゴマー組成物を含む。この点について、1つの実施形態において、本発明は、米国特許第7,163,695号、同第7,070,807号および同第6,692,911号に記載されているようなリジンおよびヒスチジンの共重合体（HK）を、単独で、またはPEG（例えば、分枝状もしくは非分枝状のPEGまたはその両方の混合物）と組み合わせて、PEGおよび標的化部分と組み合わせて、もしくは架橋剤と組み合わせた前述のいずれかで含む組成物中の本発明のオリゴマーを提供する。ある特定の実施形態において、本発明は、グルコン酸で改変されたポリヒスチジンまたはグルコニル化された（gluconylated）ポリヒスチジン／トランスフェリン-ポリリジンを含む組成

物として、アンチセンスオリゴマーを提供する。当業者は、H i sおよびL y sに類似の特性を有するアミノ酸が、その組成物中において置換され得ることも認識するだろう。

【0226】

本明細書中に記載されるオリゴマーのある特定の実施形態は、塩基性の官能基（例えば、アミノまたはアルキルアミノ）を含み得るので、薬学的に許容され得る酸と薬学的に許容され得る塩を形成することができる。この点において、用語「薬学的に許容され得る塩」は、本発明の化合物の比較的無毒性の無機酸付加塩および有機酸付加塩のことを指す。これらの塩は、投与ビヒクルもしくは剤形の製造プロセスにおいてインサイチュで調製され得るか、または遊離塩基の形態での本発明の精製された化合物を適当な有機酸もしくはは無機酸と別々に反応させ、そしてそのように形成された塩をその後の精製中に単離することによって調製され得る。代表的な塩としては、臭化水素酸塩、塩酸塩、硫酸塩、重硫酸塩、リン酸塩、硝酸塩、酢酸塩、吉草酸塩、オレイン酸塩、パルミチン酸塩、ステアリン酸塩、ラウリン酸塩、安息香酸塩、乳酸塩、リン酸塩、トシル酸塩、クエン酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、コハク酸塩、酒石酸塩、ナフチル酸塩（n a p t h y l a t e）、メシル酸塩、グルコヘプトン酸塩、ラクトビオン酸塩およびラウリルスルホン酸塩などが挙げられる（例えば、B e r g eら、J. P h a r m. S c i. 66:1-19, 1977を参照のこと）。

10

【0227】

主題オリゴマーの薬学的に許容され得る塩には、それらの化合物の従来の無毒性の塩または第四アンモニウム塩、例えば、無毒性の有機酸または無機酸からの塩が含まれる。例えば、そのような従来の無毒性の塩としては、無機酸（例えば、塩酸塩、臭化水素酸、硫酸酸、スルファミン酸、リン酸、硝酸など）から得られる塩；および有機酸（例えば、酢酸、プロピオン酸、コハク酸、グリコール酸、ステアリン酸、乳酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸塩、アスコルビン酸、パルミチン酸、マレイン酸、ヒドロキシマレイン酸、フェニル酢酸、グルタミン酸、安息香酸、サリチル（s a l i c y c l i c）酸、スルファニル酸、2-アセトキシ安息香酸、フマル酸、トルエンスルホン酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、シュウ酸酸、イセチオン（i s o t h i o n i c）酸など）から調製される塩が挙げられる。

20

【0228】

ある特定の実施形態において、本発明のオリゴマーは、1つ以上の酸性官能基を含み得るので、薬学的に許容され得る塩基と薬学的に許容され得る塩を形成することができる。これらの場合における用語「薬学的に許容され得る塩」とは、本発明の化合物の比較的無毒性の無機塩基付加塩および有機塩基付加塩のことを指す。これらの塩は、同様に、投与ビヒクルもしくは剤形の製造プロセスにおいてインサイチュで調製され得るか、または遊離酸の形態での精製された化合物を適当な塩基と別々に反応させることによって、調製され得る（例えば、薬学的に許容され得る金属カチオンと、アンモニアまたは薬学的に許容され得る有機第一級アミン、有機第二級アミンもしくは有機第三級アミンとの、水酸化物、炭酸塩または重炭酸塩）。代表的なアルカリ塩またはアルカリ土類塩としては、リチウム塩、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩およびアルミニウム塩などが挙げられる。塩基付加塩の形成に有用な代表的な有機アミンとしては、エチルアミン、ジエチルアミン、エチレンジアミン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、ピペラジンなどが挙げられ得る（例えば、B e r g eら、前出を参照のこと）。

30

40

【0229】

湿潤剤、乳化剤および滑沢剤（例えば、ラウリル硫酸ナトリウムおよびステアリン酸マグネシウム）ならびに着色剤、離型剤、コーティング剤、甘味剤、香味剤および芳香剤、保存剤および酸化防止剤もまた、本組成物中に存在し得る。

【0230】

薬学的に許容され得る酸化防止剤の例としては：（1）水溶性酸化防止剤（例えば、アスコルビン酸、塩酸システイン、重硫酸ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウムなど）；（2）油溶性酸化防止剤（例えば、パルミチン酸アスコルビル、ブチル

50

化ヒドロキシアニソール（BHA）、ブチル化ヒドロキシトルエン（BHT）、レシチン、没食子酸プロピル、アルファートコフェロールなど）；および（3）金属キレート剤（例えば、クエン酸、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）、ソルビトール、酒石酸、リン酸など）が挙げられる。

【0231】

本発明の製剤は、経口、経鼻、局所的（頬側および舌下を含む）、直腸、膣および／または非経口投与に適した製剤を含む。それらの製剤は、単位剤形で都合よく提供され得、薬学分野で周知の任意の方法によって調製され得る。1つの剤形を生成するためにキャリア材料と組み合され得る活性成分の量は、処置される宿主、特定の投与様式に応じて変動し得る。1つの剤形を生成するためにキャリア材料と組み合され得る活性成分の量は、一般に、治療効果をもたらす化合物の量であり得る。一般に、100パーセントのうち、この量は、約0.1パーセント～約99パーセントの活性成分、好ましくは、約5パーセント～約70パーセント、最も好ましくは、約10パーセント～約30パーセントの範囲であり得る。

10

【0232】

ある特定の実施形態において、本発明の製剤は、シクロデキストリン、セルロース、リポソーム、ミセル形成剤、例えば、胆汁酸および高分子キャリア、例えば、ポリエステルおよびポリ無水物から選択される賦形剤；ならびに本発明のオリゴマーを含む。ある特定の実施形態において、上述の製剤は、本発明のオリゴマーを経口的に生体利用可能にする。

20

【0233】

これらの製剤または組成物を調製する方法は、本発明のオリゴマーを、キャリアおよび必要に応じて1つ以上の副成分と会合させる工程を包含する。通常、それらの製剤は、本発明の化合物を液体キャリアもしくは微粉化された固体キャリアまたはその両方と均一かつ密接に会合させ、次いで、必要であれば、その生成物を成形することによって、調製される。

【0234】

経口投与に適した本発明の製剤は、カプセル剤、カシェ剤、丸剤、錠剤、ロゼンジ（風味がつけられた基剤、通常、スクロースおよびアカシアまたはトラガントを用いる）、散剤、顆粒剤の形態、あるいは水性液体中もしくは非水液体中の溶液もしくは懸濁液として、または水中油型もしくは油中水型の液体エマルジョンとして、またはエリキシル剤もしくはシロップ剤として、または香錠（不活性な基剤（例えば、ゼラチンおよびグリセリン、またはスクロースおよびアカシア）を用いる）として、および／または口腔洗浄薬などとしてであり得、各々は、所定量の本発明の化合物を活性成分として含む。本発明のオリゴマーは、ポーラス、舐剤またはペーストとしても投与され得る。

30

【0235】

経口投与用の本発明の固体剤形（カプセル剤、錠剤、丸剤、糖衣錠、散剤、顆粒剤、トローチ（trouche）など）において、活性成分は、1つ以上の薬学的に許容され得るキャリア（例えば、クエン酸ナトリウムまたはリン酸カルシウム）および／または以下のうちのいずれかと混合され得る：（1）充填剤または増量剤（例えば、デンプン、ラクトース、スクロース、グルコース、マンニトールおよび／またはケイ酸）；（2）結合剤（例えば、カルボキシメチルセルロース、アルギネート、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、スクロースおよび／またはアカシア）；（3）吸湿剤（例えば、グリセロール）；（4）崩壊剤（例えば、寒天、炭酸カルシウム、ジャガイモデンプンまたはタピオカデンプン、アルギン酸、ある特定のシリケートおよび炭酸ナトリウム）；（5）溶解遅延剤（例えば、パラフィン）；（6）吸収促進物質（例えば、四級アンモニウム化合物および界面活性剤、例えば、ポロキサマーおよびラウリル硫酸ナトリウム）；（7）湿潤剤（例えば、セチルアルコール、モノステアリン酸グリセロールおよび非イオン性界面活性剤）；（8）吸収剤（例えば、カオリンおよびベントナイト粘土）；（9）滑沢剤（例えば、タルク、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、固体ポリエチレングリコー

40

50

ル、ラウリル硫酸ナトリウム、ステアリン酸亜鉛、ステアリン酸ナトリウム、ステアリン酸、およびそれらの混合物)；(10)着色剤；および(11)放出制御剤(例えば、クロスポビドンまたはエチルセルロース)。カプセル剤、錠剤および丸剤の場合、薬学的組成物は、緩衝剤も含み得る。類似のタイプの固体組成物は、ラクトースまたは乳糖などのような賦形剤、ならびに高分子量ポリエチレングリコールなどを用いて、軟殻および硬殻ゼラチンカプセル内の充填剤としても使用され得る。

【0236】

錠剤は、必要に応じて1つ以上の副成分とともに、圧縮または成型によって生成され得る。圧縮錠剤は、結合剤(例えば、ゼラチンまたはヒドロキシプロピルメチルセルロース)、滑沢剤、不活性な希釈剤、保存剤、崩壊剤(例えば、デンプングリコール酸ナトリウムまたは架橋カルボキシルメチルセルロースナトリウム)、表面活性剤または分散剤を用いて調製され得る。成型錠剤は、適当な機械において、不活性な液体希釈剤で湿らせた粉末の化合物の混合物を成型することによって生成され得る。

【0237】

本発明の薬学的組成物の錠剤および他の固体剤形(例えば、糖衣錠、カプセル剤、丸剤および顆粒剤)は、必要に応じて、溝がつけられ得るか、またはコーティングおよび殻(例えば、腸溶コーティングおよび薬学的製剤化分野において周知の他のコーティング)を用いて調製され得る。それらは、例えば、所望の放出プロファイルを提供する様々な比率のヒドロキシプロピルメチルセルロース、他のポリマーマトリックス、リポソームおよび/またはミクロスフェアを用いて、その中の活性成分の緩徐な放出または制御された放出を提供するようにも製剤化され得る。それらは、迅速な放出のために製剤化され得、例えば、フリーズドライにされ得る。それらは、例えば、細菌保持フィルター(bacteria-retaining filter)による濾過によって、または滅菌水に溶解され得る滅菌された固体組成物の形態の滅菌剤、もしくは他のいくつかの滅菌された注射可能な媒質を、使用の直前に組み込むことによって、滅菌され得る。これらの組成物は、必要に応じて不透明化剤も含み得、また、それらの組成物が、消化管のある特定の部分だけでまたは優先的にその部分において活性成分を必要に応じて遅延様式で放出する組成物であり得る。使用され得る包埋組成物の例としては、重合体の物質およびろうが挙げられる。その活性成分は、適切な場合、上に記載した賦形剤の1つ以上を用いた、マイクロカプセル化された形態でもあり得る。

【0238】

本発明の化合物の経口投与用の液体剤形としては、薬学的に許容され得るエマルジョン、マイクロエマルジョン、溶液、懸濁液、シロップ剤およびエリキシル剤が挙げられる。その液体剤形は、活性成分に加えて、当該分野において通常使用される不活性な希釈剤(例えば、水または他の溶媒)、可溶化剤および乳化剤、例えば、エチルアルコール、イソプロピルアルコール、炭酸エチル、酢酸エチル、ベンジルアルコール、安息香酸ベンジル、プロピレングリコール、1,3-ブチレングリコール、油(特に、綿実油、落花生油、トウモロコシ油、胚芽油、オリーブ油、ヒマシ油およびゴマ油)、グリセロール、テトラヒドロフリルアルコール、ポリエチレングリコールおよびソルビタンの脂肪酸エステル、ならびにそれらの混合物を含み得る。

【0239】

不活性な希釈剤のほかにも、経口組成物は、佐剤(例えば、湿潤剤、乳化剤および懸濁剤、甘味剤、香味剤、着色剤、芳香剤および保存剤)も含み得る。

【0240】

懸濁液は、活性な化合物に加えて、懸濁剤、例えば、エトキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシエチレンソルビトールおよびソルビタンエステル、微結晶性セルロース、メタ水酸化アルミニウム、ベントナイト、寒天およびトラガント、ならびにそれらの混合物を含み得る。

【0241】

直腸または膣への投与用の製剤は、1つ以上の適当な非刺激性の賦形剤またはキャリア

10

20

30

40

50

(例えば、カカオバター、ポリエチレングリコール、坐剤用のろうまたはサリチレートを含み、室温では固体であるが体温では液体であるがゆえに、直腸腔または腔腔において融解して、活性化化合物を放出する)と本発明の1つ以上の化合物を混合することによって調製され得る坐剤として提供され得る。

【0242】

本明細書中に提供されるようなオリゴマーの局所的投与用または経皮的投与用の製剤または剤形としては、散剤、スプレー、軟膏、ペースト、クリーム、ローション、ゲル、溶液、パッチおよび吸入剤が挙げられる。活性化オリゴマーは、薬学的に許容され得るキャリア、および必要とされ得る任意の保存剤、緩衝剤または噴霧剤と滅菌条件下で混合され得る。その軟膏、ペースト、クリームおよびゲルは、本発明の活性化化合物に加えて、賦形剤、例えば、動物性脂肪および植物性脂肪、油、ろう、パラフィン、デンプン、トラガント、セルロース誘導体、ポリエチレングリコール、シリコーン、ベントナイト、ケイ酸、タルクならびに酸化亜鉛、またはそれらの混合物を含み得る。

10

【0243】

散剤およびスプレー剤は、本発明のオリゴマーに加えて、賦形剤(例えば、ラクトース、タルク、ケイ酸、水酸化アルミニウム、ケイ酸カルシウムおよびポリアミド粉末、またはこれらの物質の混合物)を含み得る。スプレー剤は、クロロフルオロハイドロカーボンなどの通例の噴霧剤、ならびにブタンおよびプロパンなどの揮発性非置換炭化水素をさらに含み得る。

【0244】

20

経皮パッチは、本発明のオリゴマーの身体への制御された送達を提供するという追加の利点を有する。そのような剤形は、そのオリゴマーを適切な媒質に溶解するかまたは分散させることによって、作製され得る。皮膚を越えた薬剤の流入を増加させるために、吸収促進剤も使用され得る。そのような流入の速度は、当該分野で公知の他の方法の中でも、律速膜を提供すること、またはその薬剤をポリマーマトリックスもしくはゲルに分散させることによって、制御され得る。

【0245】

非経口投与に適した薬学的組成物は、1つ以上の薬学的に許容され得る滅菌された等張性の水溶液もしくは非水溶液、分散液、懸濁液またはエマルジョン、あるいは滅菌された注射可能な溶液または分散液に使用の直前に再構成され得る滅菌された粉末(それらは、糖、アルコール、酸化防止剤、緩衝剤、静菌剤、意図されるレシピエントの血液と製剤とを等張性にする溶質、または懸濁剤もしくは増粘剤を含み得る)と組み合わせて本発明の1つ以上のオリゴマーを含み得る。本発明の薬学的組成物において使用され得る適当な水性および非水性のキャリアの例としては、水、エタノール、ポリオール(例えば、グリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど)およびそれらの適当な混合物、オリーブ油などの植物油、ならびにオレイン酸エチルなどの注射可能な有機エステルが挙げられる。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティング材料を使用すること、分散液の場合は、必要とされる粒径を維持すること、および界面活性剤を使用することによって、維持され得る。

30

【0246】

40

これらの組成物は、佐剤(例えば、保存剤、湿潤剤、乳化剤および分散剤)も含み得る。主題のオリゴマーに対する微生物の作用の防止は、様々な抗菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノールソルビン酸などを含めることによって、確実にされ得る。その組成物に等張剤(例えば、糖、塩化ナトリウムなど)を含めることも望ましい場合がある。さらに、注射可能な薬学的形態の吸収の延長は、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンなどの吸収を遅延させる物質を含めることによって生じ得る。

【0247】

場合によっては、薬物の作用を延長するために、皮下または筋肉内注射からの薬物の吸収を遅らせることが望ましい。これは、当該分野で公知の他の方法の中でも、不良な水溶

50

性を有する結晶性またはアモルファスの材料の液体懸濁液を使用することによって達成され得る。そして、その薬物の吸収速度は、その溶解速度に依存し、そしてその溶解速度は、結晶サイズおよび結晶の形状に依存し得る。あるいは、非経口的に投与される薬物の形態の吸収の遅延は、その薬物を油性ビヒクルに溶解するかまたは懸濁することによって、達成される。

【0248】

注射可能なデポー型は、ポリラクチド-ポリグリコリドなどの生分解性ポリマーにおいて主題のオリゴマーのマイクロカプセル (microencapsule) マトリックスを形成することによって作製され得る。オリゴマーとポリマーとの比および使用される特定のポリマーの性質に応じて、オリゴマー放出速度が制御され得る。他の生分解性ポリマーの例としては、ポリ(オルトエステル)およびポリ(無水物)が挙げられる。デポー注射可能製剤は、体組織と適合性のリポソームまたはマイクロエマルジョン内に薬物を封入することによっても調製され得る。

10

【0249】

本発明のオリゴマーが、ヒトおよび動物に医薬として投与されるとき、それらは、それ自体で投与され得るか、または例えば、薬学的に許容され得るキャリアと組み合わせて0.1~99% (より好ましくは、10~30%) の活性成分を含む薬学的組成物として投与され得る。

【0250】

上で述べたように、本発明の製剤または調製物は、経口的、非経口的、局所的、または直腸に投与され得る。それらは、代表的には、各投与経路に適した形態で投与される。例えば、それらは、錠剤またはカプセル剤の形態で、注射、吸入、眼用のローション、軟膏、坐剤などによって、注射、注入または吸入による投与；ローションまたは軟膏による局所的な投与；および坐剤による直腸への投与によって投与される。

20

【0251】

本明細書中で使用されるとき、句「非経口投与」および「非経口的に投与される」は、経腸および局所的投与以外の、通常、注射による投与様式のことを意味し、そのような投与としては、静脈内、筋肉内、動脈内、鞘内、嚢内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管的、皮下、表皮下、関節内 (intraarticular)、被膜下、くも膜下、脊髄内および胸骨内の注射および注入が挙げられるがこれらに限定されない。

30

【0252】

本明細書中で使用されるとき、句「全身投与」、「全身投与される」、「末梢投与」および「末梢投与される」は、化合物、薬物または他の材料が患者の系に入り、ひいては代謝および他の同様のプロセスに供されるような、中枢神経系への直接的な投与以外の投与、例えば、皮下投与のことを意味する。

【0253】

選択される投与経路に関係なく、適当な水和型で使用され得るおよび／または本発明の薬学的組成物において使用され得る本発明のオリゴマーは、当業者に公知の従来の方法によって薬学的に許容され得る剤形に製剤化され得る。本発明の薬学的組成物中の活性成分の実際の投薬量レベルは、患者にとって容認しにくいほど有毒でなく、特定の患者、組成物および投与様式に対して所望の治療的な応答を達成するのに有効な活性成分の量を得るように、変更され得る。

40

【0254】

選択される投薬量レベルは、使用される本発明の特定のオリゴマーまたはそのエステル、塩もしくはアミドの活性、投与経路、投与の時間、使用される特定のオリゴマーの排出または代謝の速度、吸収の速度および程度、処置の持続時間、使用される特定のオリゴマーと組み合わせて使用される他の薬物、化合物および／または材料、処置される患者の年齢、性別、体重、状態、全般的な健康状態および以前の病歴、ならびに医学分野において周知の同様の因子をはじめとした種々の因子に依存し得る。

【0255】

50

当該分野における通常の技量を有する医師または獣医師は、必要とされる薬学的組成物の有効量を容易に決定することができるし、処方することができる。例えば、その医師または獣医師は、所望の治療効果を達成するために、薬学的組成物において使用される本発明の化合物の用量を、必要とされるレベルよりも低いレベルで開始し得、そして所望の効果が達成されるまでその投薬量を徐々に増加させ得る。通常、本発明の化合物の適当な1日量は、治療効果をもたらすのに有効な最低の用量である化合物の量であり得る。そのような有効量は、一般に、上に記載された因子に依存し得る。一般に、示される効果のために使用されるとき、患者に対する本発明の化合物の経口、静脈内、脳室内および皮下における用量は、1日あたり体重1キログラムあたり約0.0001～約100mgの範囲であり得る。

10

【0256】

所望であれば、活性な化合物の有効な1日量は、必要に応じて単位剤形で、その日中に適切な間隔で別々に投与される2、3、4、5、6またはそれ以上の分割用量(sub-dose)で投与されてもよい。ある特定の状況において、投薬は、1日あたり1回の投与である。ある特定の実施形態において、投薬は、インフルエンザウイルスの複製を減少させるために、必要に応じ、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14日ごとまたは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12週ごと、または1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12ヶ月ごとに1回以上の投与である。

【0257】

20

核酸分子は、当業者に公知の種々の方法によって細胞に投与され得、その方法としては、リポソーム内へのカプセル化、イオン導入、または他のビヒクル(例えば、本明細書中に記載されるような、および当該分野で公知の、ヒドロゲル、シクロデキストリン、生分解性ナノカプセルおよび生体接着性ミクロスフェア)内への組み込みが挙げられるが、これらに限定されない。ある特定の実施形態では、親油性(水不溶性)医薬品のバイオアベイラビリティを改善するためにマイクロ乳化技術が利用され得る。例としては、Trimetrine(Dordunoo, S. K. ら、Drug Development and Industrial Pharmacy, 17:1685-1713, 1991)およびREV5901(Sheen, P. C. ら、Pharm Sci. 80:712-714, 1991)が挙げられる。他の利点の中でも、マイクロ乳化は、循環器系ではなくリンパ系への吸収を優先的に指示すること(それにより、肝臓を迂回し、肝胆循環における化合物の破壊を防ぐ)によってバイオアベイラビリティを増大させる。

30

【0258】

本発明の1つの態様において、製剤は、本明細書中に提供されるようなオリゴマーおよび少なくとも1つの両親媒性キャリアから形成されるミセルを含み、ここで、そのミセルは、約100nm未満の平均直径を有する。より好ましい実施形態は、約50nm未満の平均直径を有するミセルを提供し、なおもより好ましい実施形態は、約30nm未満、またはさらには約20nm未満の平均直径を有するミセルを提供する。

【0259】

適当な両親媒性キャリアのすべてが企図されるが、現在好ましいキャリアは、一般に、Generally-Recognized-as-Safe(GRAS)のステータスを有し、本発明の化合物を可溶化することができ、かつそれを、その溶液が複雑な水相(例えば、ヒト胃腸管において見られるもの)と接触した状態になった後期においてマイクロ乳化する(microemulsify)ことができる、キャリアである。通常、これらの要件を満たす両親媒性の成分は、2～20というHLB(親水性と親油性とのバランス)値を有し、それらの構造は、C-6～C-20の範囲内の直鎖脂肪族ラジカルを含む。例は、ポリエチレングリコール化された(polyethylene-glycolized)脂肪グリセリドおよびポリエチレングリコールである。

40

【0260】

両親媒性キャリアの例としては、飽和および一不飽和のポリエチレングリコール化され

50

た (polyethyleneglycolized) 脂肪酸グリセリド (例えば、完全にまたは部分的に水素化された様々な植物油から得られるもの) が挙げられる。そのような油は、好都合にも、脂肪酸トリグリセリド、脂肪酸ジグリセリドおよび脂肪酸モノグリセリド、ならびに対応する脂肪酸のジ-およびモノ-ポリエチレングリコールエステルからなり得、特に好ましい脂肪酸組成物は、カプリン酸 4~10%、カプリン酸 3~9%、ラウリン酸 40~50%、ミリスチン酸 14~24%、パルミチン酸 4~14% およびステアリン酸 5~15% を含む。両親媒性キャリアの別の有用なクラスとしては、部分的にエステル化されたソルビタンおよび/またはソルビトールが挙げられ、飽和脂肪酸もしくは一不飽和脂肪酸 (SPAN シリーズ) または対応するエトキシ化アナログ (TWEEN シリーズ) が挙げられる。

10

【0261】

Gelucire シリーズ、Labrafil、Labrasol または Lauroglycol (すべてが Gattefosse Corporation, Saint Priest, France によって製造され、流通されている)、PEG-モノ-オレエート、PEG-ジ-オレエート、PEG-モノ-ラウレートおよびジ-ラウレート、Lecithin、Polysorbate 80 など (米国および世界中のいくつかの会社によって生産され、流通されている) をはじめとした、商業的に入手可能な両親媒性のキャリアが特に有用であり得る。

【0262】

ある特定の実施形態において、送達は、本発明の組成物を適当な宿主細胞に導入するためのリポソーム、ナノカプセル、微小粒子、ミクロスフェア、脂質粒子、ベシクルなどの使用によって行われ得る。特に、本発明の組成物は、脂質粒子、リポソーム、ベシクル、ナノスフェア、ナノ粒子などに被包された送達のために製剤化され得る。そのような送達ベシクルの製剤化および使用は、公知および従来の手法を用いて行われ得る。

20

【0263】

本発明における使用に適した親水性ポリマーは、直ちに水溶性であり、ベシクル形成脂質に共有結合的に付着され得、かつ、有毒作用なくインビボにおいて許容される (すなわち、生体適合性である)、ポリマーである。適当なポリマーとしては、ポリエチレングリコール (PEG)、ポリ乳酸 (ポリラクチドとも呼ばれる)、ポリグリコール酸 (ポリグリコリドとも呼ばれる)、ポリ乳酸-ポリグリコール酸共重合体、およびポリビニルアルコールが挙げられる。ある特定の実施形態において、ポリマーは、約 100 もしくは 120 ダルトンから約 5,000 もしくは 10,000 ダルトンまでの分子量、または約 300 ダルトン~約 5,000 ダルトンの分子量を有する。他の実施形態において、ポリマーは、約 100~約 5,000 ダルトンの分子量、または約 300~約 5,000 ダルトンの分子量を有するポリエチレングリコールである。ある特定の実施形態において、ポリマーは、750 ダルトンのポリエチレングリコール (PEG (750)) である。ポリマーは、その中のモノマーの数によっても定義され得る; 本発明の好ましい実施形態は、3つのモノマーからなる PEG ポリマー (約 150 ダルトン) のような少なくとも約 3つのモノマーのポリマーを使用する。

30

【0264】

本発明における使用に適し得る他の親水性ポリマーとしては、ポリビニルピロリドン、ポリメトキサゾリン、ポリエチルオキサゾリン、ポリヒドロキシプロピルメタクリルアミド、ポリメタクリルアミド、ポリジメチルアクリルアミドおよび誘導体化セルロース (例えば、ヒドロキシメチルセルロースまたはヒドロキシエチルセルロース) が挙げられる。

40

【0265】

ある特定の実施形態において、本発明の製剤は、ポリアミド、ポリカーボネート、ポリアルキレン、アクリル酸エステルとメタクリル酸エステルとのポリマー、ポリビニルポリマー、ポリグリコリド、ポリシロキサン、ポリウレタンおよびその共重合体、セルロース、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリスチレン、乳酸とグリコール酸とのポリマー、ポリ無水物、ポリ (オルト) エステル、ポリ (酪酸 (butyric acid))、ポリ (吉

50

草酸)、ポリ(ラクチド- α -カプロラクトン)、多糖、タンパク質、ポリヒアルロン酸、ポリシアノアクリレート、ならびにそれらの混和物、混合物または共重合体からなる群から選択される生体適合性ポリマーを含む。

【0266】

シクロデキストリンは、ギリシャ文字 α 、 β または γ によって指し示されるそれぞれ6、7または8つのグルコース単位からなる環状オリゴ糖である。それらのグルコース単位は、 $\alpha-1$, 4グルコシド結合によって連結される。糖単位の椅子形配座の結果として、すべての二級ヒドロキシル基(C-2、C-3におけるもの)が、その環の片側に位置し、C-6におけるすべての一級ヒドロキシル基が、他方の側に位置する。結果として、外面は親水性であり、それにより、シクロデキストリンは水溶性である。対照的に、シクロデキストリンのくぼみは、原子C-3およびC-5の水素によって、ならびにエーテル様酸素によって裏打ちされているので、疎水性である。これらのマトリックスは、種々の比較的疎水性の化合物(例えば、17 α -エストラジオールなどのステロイド化合物を含む)との錯体形成を可能にする。その錯体形成は、ファンデルワールス相互作用および水素結合の形成によって起こる。シクロデキストリンの化学に関する一般的な概説については、Wenz, Agnew, Chem. Int. Ed. Engl, 33:803-822, 1994を参照のこと。

10

【0267】

シクロデキストリン誘導体の物理化学的特性は、置換の種類および程度に強く依存する。例えば、それらの水溶解性は、不溶性(例えば、トリアセチルベーターシクロデキストリン)から147%溶解性(w/v)(G-2ベーターシクロデキストリン)までに及ぶ。さらに、それらは、多くの有機溶媒にも可溶性である。これらのシクロデキストリンの特性のおかげで、様々な製剤の構成要素の溶解性を増加させるかまたは減少させることによって、それらの溶解性の制御が可能になる。

20

【0268】

数多くのシクロデキストリン、およびそれらを調製するための方法が、記載されている。例えば、Parmer (I)ら(米国特許第3,453,259号)およびGrameraら(米国特許第3,459,731号)は、電気的中性のシクロデキストリンを記載した。他の誘導体としては、カチオン特性を有するシクロデキストリン(Parmer (II)、米国特許第3,453,257号)、不溶性の架橋シクロデキストリン(Solms、米国特許第3,420,788号)およびアニオン特性を有するシクロデキストリン(Parmer (III)、米国特許第3,426,011号)が挙げられる。アニオン特性を有するシクロデキストリン誘導体に共通して、カルボン酸、亜リン酸、亜ホスフィン酸、ホスホン酸、リン酸、チオホスホン酸、チオスルフィン酸およびスルホン酸が、親シクロデキストリンに付加されている(Parmer (III)、前出を参照のこと)。さらに、スルホアルキルエーテルシクロデキストリン誘導体が、Stellaらによって記載されている(米国特許第5,134,127号)。

30

【0269】

リポソームは、水性の内部コンパートメントを囲い込んでいる少なくとも1つの脂質二重層膜からなる。リポソームは、膜のタイプおよびサイズによって特徴付けられ得る。小型単層ベシクル(SUV)は、単一の膜を有し、代表的には、直径が0.02~0.05 μm の範囲であり;大型単層ベシクル(LUVS)は、代表的には、0.05 μm より大きい。オリゴグラメラの大型ベシクルおよび多層ベシクルは、複数の、通常、同心円状の膜の層を有し、代表的には、0.1 μm より大きい。いくつかの非同心円状の膜を有するリポソーム、すなわち、より大きなベシクル内に含まれるいくつかのより小型のベシクルは、多胞(multivesicular)ベシクルと呼ばれる。

40

【0270】

本発明の1つの態様は、本発明のオリゴマーを含むリポソームを含む製剤に関し、ここで、そのリポソーム膜は、高い運搬能を有するリポソームを提供するように製剤化される。二者択一的または追加的に、本発明の化合物は、リポソームのリポソーム二重層内に含

50

められ得るか、またはリポソーム二重層上に吸着され得る。本発明のオリゴマーは、脂質界面活性剤とともに凝集され得、リポソームの内部空間の中に保持され得る；これらの場合、リポソーム膜は、活性な薬剤－界面活性剤の凝集物の崩壊作用に抵抗するように製剤化される。

【0271】

本発明の1つの実施形態においては、リポソームの脂質二重層は、ポリエチレングリコール（PEG）で誘導体化された脂質を含み、そのPEG鎖は、脂質二重層の内側の表面から、リポソームによって被包されている内側の空間内に伸び、かつ、脂質二重層の外側から周辺環境に向かって伸びている。

【0272】

本発明のリポソーム内に含まれる活性な薬剤は、可溶化型である。界面活性剤と活性な薬剤との凝集物（例えば、目的の活性な薬剤を含むエマルジョンまたはミセル）は、本発明におけるリポソームの内部空間内に封入され得る。界面活性剤は、その活性な薬剤を分散させるようにおよび可溶化するように作用し、任意の適当な脂肪族、脂環式または芳香族の界面活性剤（様々な長さの鎖の（例えば、約C14～約C20の）生体適合性リゾホスファチジルコリン（LPC）が挙げられるがこれに限定されない）から選択され得る。PEG－脂質などのポリマーによって誘導体化された脂質は、ミセル／膜融合を阻害するように作用するので、および界面活性剤分子へのポリマーの付加が、界面活性剤のCMCを減少させ、ミセル形成を助けるので、そのような脂質もまたミセル形成のために利用され得る。マイクロモル濃度の範囲内のCMCを有する界面活性物質が好ましい；それより高いCMCの界面活性剤も、本発明のリポソーム内に封入されるミセルを調製するために利用され得る。

【0273】

本発明におけるリポソームは、当該分野で公知の種々の手法のいずれかによって調製され得る。例えば、米国特許第4,235,871号；公開されたPCT出願WO96/14057；New RRC, *Liposomes: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford (1990), pages 33-104；Lasic DD, *Liposomes from physics to applications*, Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, 1993を参照のこと。例えば、本発明のリポソームは、そのリポソーム中において望まれる誘導体化された脂質の最終モルパーセントに対応する濃度において、親水性ポリマーで誘導体化された脂質を予め成形されたリポソーム中に拡散することによって（例えば、予め成形されたリポソームを、脂質グラフトポリマーから構成されるミセルに曝露することによって）調製され得る。親水性ポリマーを含むリポソームは、当該分野で公知であるように、均質化、脂質フィールド水和（lipid-field hydration）または押出法によっても形成され得る。

【0274】

別の例示的な製剤化手順において、活性な薬剤は、まず、リゾホスファチジルコリン中、または疎水性分子を容易に可溶化する他の低CMC界面活性剤（ポリマーグラフト脂質を含む）中における超音波処理によって分散される。次いで、得られた活性な薬剤のミセル懸濁液を用いることにより、適当なモルパーセントのポリマーグラフト脂質またはコレステロールを含む乾燥された脂質サンプルを再水和する。次いで、当該分野で公知であるような押出法を用いて、脂質および活性な薬剤の懸濁液をリポソーム中に形成し、得られたリポソームを、標準的なカラム分離によって、被包されていない溶液から分離する。

【0275】

本発明の1つの態様において、選択されたサイズ範囲内の実質的に均一なサイズを有するリポソームが調製される。1つの有効なサイジング方法は、リポソームの水性懸濁液を、選択された均一のポアサイズを有する一連のポリカーボネート膜に通過させて押し出す工程を包含する；その膜のポアサイズは、その膜を通過する押し出しによって生成されたリポソームの最も大きいサイズにおおよそ対応し得る。例えば、米国特許第4,737,

323号を参照のこと。ある特定の実施形態において、DharmaFECT（登録商標）およびLipofectamine（登録商標）などの試薬が、ポリヌクレオチドまたはタンパク質を細胞内に導入するために利用され得る。

【0276】

本発明の製剤の放出の特徴は、被包材料、被包される薬物の濃度、および放出改変物質（release modifiers）の存在に依存する。例えば、放出は、例えば、胃におけるような低pHまたは腸におけるようなより高いpHのときだけ放出するpH感受性コーティングを用いて、pH依存性であるように操作され得る。腸溶コーティングは、胃を通過した後まで放出が起きるのを妨げるために使用され得る。種々の材料に被包されたシアナミドの複数のコーティングまたは混合物が、胃における最初の放出、それに続く、腸における後の放出をもたらすために使用され得る。放出は、塩またはポア形成剤を含めること（これにより、水の取り込み、またはカプセルからの拡散による薬物の放出が増加され得る）によっても操作され得る。薬物の溶解性を改変する賦形剤は、放出速度を制御するためにも使用され得る。マトリックスの分解またはマトリックスからの放出を増大する薬剤もまた、組み込まれ得る。それらは、その化合物に応じて、薬物に付加されるか、別個の相として（すなわち、微粒子として）加えられ得るか、またはポリマー相に同時に溶解され得る。ほとんどの場合、その量は、0.1～30パーセント（w/wポリマー）であるべきである。分解促進物質のタイプとしては、無機塩（例えば、硫酸アンモニウムおよび塩化アンモニウム）、有機酸（例えば、クエン酸、安息香酸およびアスコルビン酸）、無機塩基（例えば、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、炭酸カルシウム、炭酸亜鉛および水酸化亜鉛）および有機塩基（例えば、硫酸プロタミン、スペルミン、コリン、エタノールアミン、ジエタノールアミンおよびトリエタノールアミン）、ならびに界面活性剤（例えば、Tween（登録商標）およびPluronic（登録商標））が挙げられる。マトリックスに微細構造を付加するポア形成剤（すなわち、無機塩および糖などの水溶性化合物）が、微粒子として加えられる。その範囲は、代表的には、1～30パーセント（w/wポリマー）である。

【0277】

取り込みは、腸内における粒子の滞留時間を変更することによっても操作され得る。これは、例えば、その粒子を粘膜接着性ポリマーでコーティングするか、または被包材料として粘膜接着性ポリマーを選択することによって、達成され得る。例としては、遊離カルボキシル基を有するほとんどのポリマー（例えば、キトサン、セルロース、および特にポリアクリレート）が挙げられる（本明細書中で使用されるとき、ポリアクリレートとは、アクリレート基および改変されたアクリレート基（例えば、シアノアクリレートおよびメタクリレート）を含むポリマーのことを指す）。

【0278】

オリゴマーは、外科的もしくは医学的なデバイスもしくは埋没物の中に含まれるように製剤化されるか、またはそれらによる放出に適応されるように製剤化され得る。ある特定の態様において、埋没物は、オリゴマーでコーティングされ得るか、またはオリゴマーで別途処理され得る。例えば、ヒドロゲルまたは他のポリマー（例えば、生体適合性および/または生分解性のポリマー）を用いて、埋没物が本発明の組成物でコーティングされ得る（すなわち、その組成物は、ヒドロゲルまたは他のポリマーを使用することによる、医学的デバイスを用いた使用に対して適合され得る）。医学的デバイスのある薬剤でコーティングするためのポリマーおよび共重合体は、当該分野で周知である。埋没物の例としては、ステント、薬物溶出ステント、縫合糸、プロステーシス、血管カテーテル、透析カテーテル、血管移植片、人工心臓弁、心臓ペースメーカー、植え込み型除細動器、IV針、骨の整復および形成のためのデバイス（例えば、釘、ねじ、プレートおよび他のデバイス）、ならびに創傷治癒のための人工組織マトリックスが挙げられるが、これらに限定されない。

【0279】

本明細書中に提供される方法に加えて、本発明に従って使用するためのオリゴマーは、

他の医薬から類推して、ヒトまたは獣医学において使用するための任意の好都合な方法での投与用に製剤化され得る。それらのアンチセンスオリゴマーおよび対応する製剤は、単独で、またはインフルエンザウイルス感染の処置における他の治療ストラテジー（例えば、商品名TAMIFLU（登録商標）として売買されているOsetamivir）と組み合わせて、投与され得る。

【0280】

本発明においては、アンチセンスオリゴマーの送達経路としては、経口および非経口の経路、例えば、静脈内、皮下、腹腔内および筋肉内をはじめとした様々な全身性の経路、ならびに吸入、経皮的、肺および局所的の送達が挙げられるが、これらに限定されない。適切な経路は、処置中の被験体の状態にとって適切であるように当業者によって決定され得る。例えば、皮膚のウイルス感染の処置におけるアンチセンスオリゴマーの送達にとって適切な経路は、局所的送達であり、ウイルス呼吸器感染症（例えば、インフルエンザA）を処置するためのアンチセンスオリゴマーの送達は、吸入、鼻腔内または肺送達による送達である。オリゴマーはまた、ウイルス感染部位または血流に直接送達されてもよい。

【0281】

アンチセンスオリゴマーは、生理的に許容され得る任意の好都合なビヒクルにおいて投与され得る。そのような組成物は、当業者によって使用される種々の標準的な薬学的に許容され得るキャリアのいずれかを含み得る。例としては、食塩水、リン酸緩衝食塩水（PBS）、水、水性エタノール、エマルジョン（例えば、油／水エマルジョンまたはトリグリセリドエマルジョン）、錠剤およびカプセルが挙げられるが、これらに限定されない。適当な生理的に許容され得るキャリアの選択は、選択される投与様式に依存して変動し得る。

【0282】

場合によっては、上で述べたように、細胞内へのアンチセンスオリゴヌクレオチドの取り込みを促進するためにリポソームが使用され得る（例えば、Williams, S. A., Leukemia. 10 (12): 1980-1989, 1996; Lappalainenら、Antiviral Res. 23: 119, 1994; Uhlmannら、Antisense Oligonucleotides: A New Therapeutic Principle, Chemical Reviews, Volume 90, No. 4, pages 544-584, 1990; Gregoriadis, G., Chapter 14, Liposomes, Drug Carriers in Biology and Medicine, pp. 287-341, Academic Press, 1979を参照のこと）。ヒドロゲルは、例えば、WO93/01286またはPCT出願番号US1992/005305に記載されているように、アンチセンスオリゴマー投与に対するビヒクルとしても使用され得る。あるいは、オリゴヌクレオチドは、ミクロスフェアまたは微小粒子として投与され得る（例えば、Wu, G. Y. and Wu, C. H., J. Biol. Chem. 262: 4429-4432, 1987を参照のこと）。あるいは、米国特許第6, 245, 747号に記載されているように、アンチセンスオリゴマーと複合体化された、ガスで満たされた微小気泡の使用によって、標的組織への送達が増大し得る。

【0283】

徐放組成物もまた使用され得る。これらは、成形された物品（例えば、フィルムまたはマイクロカプセル）の形態の半透性のポリマーマトリックスを含み得る。

【0284】

本方法の1つの態様において、被験体は、ヒト被験体、例えば、局在性または全身性のウイルス感染を有すると診断された患者である。例えば、（1）免疫無防備状態の患者；（2）熱傷被害者の患者；（3）留置カテーテルを有する患者；または（4）外科術をまさに受けようとしている患者もしくは最近外科術を受けた患者の場合、患者の状態は、本発明のアンチセンスオリゴマーの予防的投与を要求することもある。1つの好ましい実施形態において、オリゴマーは、薬学的に許容され得るキャリア中に含まれたホスホロジ

アミデートモルホリノオリゴマーであり、経口的に送達される。別の好ましい実施形態において、オリゴマーは、薬学的に許容され得るキャリア中に含まれたホスホロジアミデートモルホリノオリゴマーであり、静脈内（i. v.）送達される。

【0285】

本アンチセンス化合物は、少なくとも200～400 nMのアンチセンスオリゴマーというピーク血中濃度もたらすのに有効な量および様式で投与され得る。代表的には、アンチセンスオリゴマーは、一般に、約1～2週間にわたって、一定間隔で1回以上投与される。経口投与にとって好ましい用量は、約1～100 mg オリゴマー／70 kg である。場合によっては、100 mg オリゴマー／患者より多い用量が必要であり得る。i. v. 投与の場合、好ましい用量は、約1 mg～500 mg オリゴマー／70 kg である。アンチセンスオリゴマーは、短い期間にわたって一定間隔で、例えば、2週間またはそれより短い期間にわたって毎日、投与され得る。しかしながら、場合によっては、オリゴマーは、それよりも長い期間にわたって断続的に投与される。投与は、抗生物質の投与または他の治療的な処置の前に、またはそれらと同時に、行われ得る。その処置レジメンは、処置中の被験体のイムノアッセイ、他の生化学的試験および生理学的検査の結果に基づいて、示されるように調整され得る（用量、頻度、経路など）。

【0286】

処置のモニタリング

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いる有効なインビボ処置レジメンは、投与の持続時間、用量、頻度および経路、ならびに処置中の被験体の状態（すなわち、局在性または全身性の感染に応答した投与に対する予防的投与）に応じて、変動し得る。したがって、そのようなインビボ治療は、処置中のウイルス感染の特定のタイプにとって適切な試験によってモニターすること、および最適な治療成績を達成するために用量または処置レジメンの調整を対応させることを必要とすることが多い。処置は、例えば、一般的な感染指標（例えば、全血球計算値（CBC）、核酸検出法、免疫診断試験、ウイルス培養、またはヘテロ二重鎖の検出）によってモニターされ得る。

【0287】

インビボで投与された本発明のアンチセンスオリゴマーの、1つ以上のタイプのRNAウイルスの増殖の阻害または排除における有効性は、そのアンチセンスオリゴマーの投与前、投与中および投与後に被験体から採取された生物学的サンプル（組織、血液、尿など）から測定され得る。そのようなサンプルのアッセイとしては、（1）当業者に公知の手順（例えば、電気泳動的ゲル移動度アッセイ）を用いて、標的配列および非標的配列とのヘテロ二重鎖の形成の有無をモニターすること；（2）ELISAもしくはウエスタンブロットティングなどの標準的な手法によって測定される、ウイルスタンパク質の産生量をモニターすること、または（3）例えばSpearman-Kärberの方法によって、ウイルス力価に対する作用を測定することが挙げられる（例えば、Pari, G. S. ら、Antimicrob. Agents and Chemotherapy. 39（5）：1157-1161, 1995；Anderson, K. P. ら、Antimicrob. Agents and Chemotherapy. 40：2004-2011, 1996；Cottrel, G. E. (ed)：Manual of Standard Methods for Veterinary Microbiology, pp. 60-93, 1978を参照のこと）。

【0288】

参考文献

【0289】

【数 1】

- Abes, R., H. M. Moulton, *et al.* (2008). "Delivery of steric block morpholino oligomers by (R-X-R)₄ peptides: structure-activity studies." Nucleic Acids Res.
- Cox, N. J. and K. Subbarao (1999). "Influenza." Lancet **354**(9186): 1277-82.
- Cox, N. J. and K. Subbarao (2000). "Global epidemiology of influenza: past and present." Annu Rev Med **51**: 407-21.
- Egholm, M., O. Buchardt, *et al.* (1993). "PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules." Nature **365**(6446): 566-8. 10
- Jearawiriyapaisarn, N., H. M. Moulton, *et al.* (2008). "Sustained Dystrophin Expression Induced by Peptide-conjugated Morpholino Oligomers in the Muscles of mdx Mice." Mol Ther.
- Marshall, N. B., S. K. Oda, *et al.* (2007). "Arginine-rich cell-penetrating peptides facilitate delivery of antisense oligomers into murine leukocytes and alter pre-mRNA splicing." Journal of Immunological Methods **325**(1-2): 114-126.

【 0 2 9 0 】

【数 2】

- Moulton, H. M., M. H. Nelson, *et al.* (2004). "Cellular uptake of antisense morpholino oligomers conjugated to arginine-rich peptides." Bioconjug Chem **15**(2): 290-9. 20
- Munster, V. J., E. de Wit, *et al.* (2009). "Pathogenesis and Transmission of Swine-Origin 2009 A(H1N1) Influenza Virus in Ferrets." Science.
- Stein, C. A., J. B. Hansen, *et al.* (2010). "Efficient gene silencing by delivery of locked nucleic acid antisense oligonucleotides, unassisted by transfection reagents." Nucleic Acids Res **38**(1): e3.
- Strauss, J. H. and E. G. Strauss (2002). Viruses and Human Disease. San Diego, Academic Press. 30
- Summerton, J. and D. Weller (1997). "Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties." Antisense Nucleic Acid Drug Dev **7**(3): 187-95.
- Wu, B., H. M. Moulton, *et al.* (2008). "Effective rescue of dystrophin improves cardiac function in dystrophin-deficient mice by a modified morpholino oligomer." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(39): 14814-9.

本明細書中で引用される各個別の刊行物または特許出願が、参考として援用されると具体的かつ個別に示されたかのように、それらの刊行物および特許出願のすべてが、本明細書中で参考として援用される。 40

【 0 2 9 1 】

前述の本発明は、理解を明確にする目的での例証および例示を意図していくらか詳細に記載されてきたが、本発明の教示に鑑みて、添付の請求項の精神または範囲から逸脱することなく、ある特定の変更および改変がそれらに対して行われ得ることが当業者に直ちに明らかになるだろう。以下の実施例は、限定を意図せずに例証だけを意図して提供される。当業者は、本質的に類似の結果をもたらすために、変更され得るかまたは改変され得る種々の重大でないパラメータを直ちに認識するだろう。

【実施例】

【 0 2 9 2 】

A. 材料および方法

すべてのペプチドが、Global Peptide Services (Ft. Collins, CO) または AVI BioPharma (Corvallis, OR) によってカスタム合成され、>90%の純度に精製された(下記の実施例2を参照のこと)。PMOは、例えば、(Summerton and Weller 1997) および米国特許第5,185,444号に記載され、さらにPCT出願番号US08/012804に記載されているような公知の方法に従って、AVI BioPharmaにおいて合成された。そのPMOの例示的な構造は、図1A~Cに示されているとおりである。2'-OMeオリゴマーは、Integrated DNA Technologies Inc., Skokie, ILが合成した。LNAオリゴマーは、Biosynthesis, Inc., Lewisville, TXが生成した。

10

【0293】

記載されているように(米国特許第7,468,418号、PCT出願番号US08/008168および(Marshall, Odaら、2007; Abes, Moultonら、2008))、細胞取り込みを増大するために、PMOオリゴマーのいくつかを3'末端においてアルギニンリッチペプチド((RAhxRRBR)₂AhxBまたは(RAhxR)₄AhxB;それぞれ配列番号124および118)と結合体化することにより、ペプチド結合体化PMO(PPMO)を形成した。

【0294】

(1-ピペラジノ)ホスフィニリデンオキシ結合を含むモルホリノサブユニットを生成するために使用され得る合成経路は、PCT出願番号US07/011435に記載されており、代表的な合成についてのさらなる実験上の詳細は下記に提供される。ピペラジンと塩化トリチルとの反応により、トリチルピペラジンが得られ、それをコハク酸塩として単離した。弱塩基(例えば、ジイソプロピルエチルアミンまたはDIEA)の存在下におけるトリフルオロ酢酸エチルとの反応により、1-トリフルオロアセチル-4-トリチルピペラジンが提供され、それを直ちにHClと反応させることにより、その塩を良好な収量で得た。ジクロロホスホリル部分の導入を、トルエン中のオキシ塩化リンを用いて行った。

20

【0295】

その酸塩化物を、米国特許第5,185,444号またはSummerton and Weller, 1997(上で引用された)に記載され、さらにPCT出願番号US08/012804に記載されているように調製され得るモルホリノサブユニット(mon)と反応させることにより、活性化されたサブユニットが得られる。必要であれば、ヌクレオシド塩基に対して適当な保護基を使用する;例えば、アデニンおよびシトシンに対してはベンゾイル、グアニンに対してはフェニルアセチル、ならびにイノシンに対してはピバロイルメチル。(1-ピペラジノ)ホスフィニリデンオキシ結合を含むサブユニットが、例えば、Summerton and Weller(1997)に記載されているような既存のPMO合成プロトコルに、改変なしで組み込まれ得る。

30

【0296】

実施例1

40

マウスモデル系におけるインフルエンザAウイルスの阻害

インフルエンザAウイルス感染のマウスモデルを用いて、その感染に関する代表的なアンチセンスオリゴマーのインビボでの有効性を測定した。インフルエンザA亜型H2N3(Port Chalmers/1/73)を用いて、50マイクロリットル体積中約4×10⁴プラーク形成単位の鼻腔内投与により、Balb/c雌マウスに感染させた。この研究では、1群あたり12匹のマウスを使用し、2日目にウイルス力価の測定のために6匹を取り出し、6日目にウイルス力価の測定のために6匹を取り出した。副次エンドポイントには、体重減少の防止および生存が含まれた。

【0297】

表1および下記の表6に列挙されているような3つの試験アンチセンスオリゴマー化合

50

物、PB1-AUG+15、M1/M2-AUGおよびNP-v3'（配列番号12、13および30～33）を、ペプチド結合体化（PPMO）および正電荷結合化学（PMO plus（商標））の両方として評価した。PMOの3'末端に結合体化されたCP06062ペプチド（配列番号124）を用いて、そのPPMOを合成した。用量依存的関係を確立するために、各試験薬剤を3つの用量レベル（10、30および100マイクログラム）において評価した。投薬は、0日目における感染の4時間前から開始して、次いで4日目まで毎日、合計5回、鼻腔内経路を介して行われた。この研究の主要エンドポイントは、肺組織1グラムあたりのプラーク形成単位として測定される、肺におけるウイルス力価の減少だった。

【0298】

表6．H3N2マウスモデルにおいて使用されたアンチセンスオリゴマー

【0299】

【表6】

名称	配列	3'末端	配列番号
NP-v3'	AGC AAA AGC AGI GTA GAT AAT C	CP06062	30
NP-v3'plus	AGC AAA AGC AGI G+TA GA+T AA+T C	H	31
M1/M2-AUG	CGG TTA GAA GAC TCA TCT TT	CP06062	12
M1/M2-AUGplus (AVI-7100)	CGG T+TA GAA GAC +TCA TC+T TT	H	13
PB1-AUG+15	CGG ATT GAC ATC CAT TCA AAT G	CP06062	32
PB1-AUG+15plus	CGG AT+T GAC A+TC CAT +TCA AAT G	H	33

図6は、感染後6日目におけるウイルス力価に対する効果を示している。各ウイルス力価は、6種のPPMOおよび6種のPMO plus（商標）で処置された動物の平均である。M1/M2-AUGを標的にする化合物（配列番号12および13）は、試験された他の化合物と比べて実質的に高い活性を示した。図6に示される、ネガティブコントロールのデングによる処置からのウイルス力価は、デングウイルスを標的にしている無関係のPPMOおよびPMO plus（商標）配列を用いて得られた。

【0300】

実施例2

フェレットモデル系におけるインフルエンザAウイルスの阻害

本発明を支持する1つの所見は、新規H1N12009（S-OIV）ウイルスを用いたときの、飼育されているフェレット（*Mustela putorius furo*）動物モデル系における本発明の化合物の抗ウイルスの有効性の立証だった。フェレットモデルの利点としては、マウス馴化株とは対照的にインフルエンザウイルスの天然のヒト単離株を使用できること、および発熱および鼻汁などのヒトにおいて観察されるほとんどの臨床的徴候の発症が挙げられる（Munster, de Witら、2009）。

【0301】

6匹のフェレットを、Centers for Disease Controlから入手した2009年のTamiflu耐性H1N1株（汎発性ブタインフルエンザ）に感染させた。ウイルス感染の経路は、1日目において鼻腔内（ 4×10^4 プラーク形成単位）であり、投薬は、PMO plus（商標）化合物に対しては腹腔内（ip）注射、またはPPMO化合物に対しては鼻腔内（in）によって行われた。デングを標的にするネガティブコントロールPMO plus（商標）（30mg/kg ip用量）およびPPM

O (1.5 mg/kg 用量) 化合物を、上記の実施例 1 に記載されたように投与した。PMOplus (商標) 化合物に対する用量は、M1/M2-AUGplus (配列番号 13; AVI-7100) に対しては 10 および 30 mg/kg であり、3' 末端において配列番号 124 に結合体化された M1/M2-AUG PPMO (配列番号 12) に対しては 0.5 および 1.5 mg/kg だった。投薬は、感染の 4 時間前、ならびに 1、3 および 5 日目に行われた。アンチセンス化合物と並行して、Tamiflu (Oseteltamivir) を抗ウイルス薬のポジティブコントロールとして投与した (10 mg/kg 用量)。ネガティブコントロールとして食塩水も含めた。

【0302】

生存中の所見には、体重増加 (図 7A)、くしゃみ (図 7B)、鼻汁 (図 7C) および呼吸窮迫 (図 7D) が含まれた。M1/M2-AUG を標的にする化合物は、体重減少を防ぎ、くしゃみ、鼻汁および呼吸窮迫を減少させた。感染後の 1 日目～5 日目における鼻洗浄液からのウイルス力価を、図 7E に曲線下面積 (AUC) 組織培養感染量 (TCID₅₀) として示す。M1/M2-AUG PPMO は、食塩水と比べて 2.3 log の減少 (99.6% 減少) および Tamiflu に対して 1.1 log 超の減少 (94.4% 超) を示した。

【0303】

AVI-7100 (配列番号 13) の有効性をさらに評価するために、インフルエンザ M1/M2 セグメントの翻訳開始部位を標的にする PMOplus を、オセルタミビル耐性非馴化 H1N1 (SOIV) 汎発性インフルエンザウイルスに感染したフェレットにおいて試験した。合計 36 匹の雄フェレットを本研究において使用した。研究の開始時に約 700 g という一致した体重を有した雄フェレットを 5 つの処置群 (下記の表 7 に示される) のうちの 1 つに無作為化し、ウイルスがケージ間で伝染するのを最小にするために、Hepa フィルター付きケージ (filtered cages) に収容した (1 ケージあたり 4 匹)。それらのケージは、Tulane University Medical Center BSL-2 研究室内で維持された。

【0304】

表 7. フェレット研究デザイン

【0305】

【表 7】

群	薬剤	化学	用量 (mg/kg)	経路	スケジュール	7日目に 屠殺
1	Tamiflu	-	5	p.o.	-4H, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120H	8
2	M1/M2	PMOplus	30	i.p.	-4H, 1, 2, 3, 4, 5D	8
3	M1/M2	PMOplus	10	i.p.	-4H, 1, 2, 3, 4, 5D	8
4	食塩水	-	0.5	i.n.	-4H, 1, 2, 3, 4, 5D	6
5	M1/M2 および Tamiflu	PMOplus -	10 5	i.p. p.o.	-4H, 1, 2, 3, 4, 5D -4H, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120H	6
	合計					36

ウイルス負荷の1～4時間前にフェレットをAVI-7100で処置した。投与経路は、群2、3および5については腹腔内であり；群1については経口だった。投薬間隔は、ウイルス負荷の4時間後、24、48、72、96および120時間後だった。5つの群を以下のとおり処置した：群1には、オセルタミビルを経口経路によって12時間ごとに5mg/kgで投与し、群2には、AVI-7100（PMOplus化合物；5'-CGGT+TAGAAGAC+TCATC+TTT-3'）をi.p.経路によって10mg/kgの用量で投与し、群3には、AVI-7100（PMOplus化合物）をi.p.経路によって30mg/kgの用量で投与し、群4には、滅菌された食塩水コントロールをi.p.経路によって投与し、群5には、i.p.経路によってAVI-7100を1日に1回、10mg/kgで、およびオセルタミビルを1日に2回、5mg/kgで投与した。群1～2（各々8匹のフェレット）と群4～5（各々6匹のフェレット）との間で群サイズが異なることについての理由は、研究開始時におけるインフルエンザA血清陰性フェレットの入手可能性が限られていたことに起因した。

【0306】

本研究に含められたすべてのフェレットが、感染後8日目の研究の終了時まで生存していたことから、これらの動物が非常に健常だったか、またはこの特定のウイルスがこのモデルにおいて非常に病原性でなかったことが示唆される。それにもかかわらず、下記に示されるように、これらの結果は、AVI-7100による処置が、未処置のコントロールまたはオセルタミビルで処置されたコントロールと比べてインフルエンザウイルス感染の症状を有意に減少させることを示すだけでなく、AVI-7100とオセルタミビルとの併用によって達成され得る相乗効果も明示する。臨床所見（clinical observations）の要旨を下記の表8に示す。

【0307】

表8：臨床所見

【0308】

【表8】

群	臨床スコア	体重の変化 (g/日)			最高体温 (°F)		
		前	後	差	前	後	差
Tamiflu	1.17±0.25	15.1±0.4	8.5±3.2	-6.1	104.4	105.7	+1.3
M1-30	1.00±0.00	11.8±0.8	12.6±2.0	+0.8	104.7	104.2	-0.5
M1-10	1.11±0.21	16.6±0.8	10.9±1.5	-5.7	105.4	106.1	+0.7
食塩水	1.19±0.25	14.3±0.6	11.4±2.1	-2.9	105.9	106.2	+0.3
M1+Tamiflu	1.06±0.06	14.4±0.6	14.9±1.0	+0.5	105.0	104.9	-0.1

さらなる指標として、上気道に浸潤する細胞の所見が、感染の重症度の尺度である。鼻洗浄液中のマクロファージの細胞性の要旨を下記の表9に含める。さらに、未処置のフェレットおよびオセルタミビルだけで処置されたフェレットは、顕著な肺炎（肺の炎症）、大量の浸潤細胞（リンパ球および好中球を含む）および肺胞壁の中程度の肥厚とともに、肺において有意なうっ血を示した。対照的に、AVI-7100で処置された（オセルタミビルありまたはなし）フェレットは、肺におけるうっ血を示さず、軽度の肺炎およびわずかな浸潤細胞を示しただけだった。

【0309】

表9．上気道におけるマクロファージの細胞性

【0310】

【表 9】

群	平均 ± 標準偏差	3日目のピーク
Tamiflu	2.98 ± 2.71	7.91 ± 7.28
M1-30	2.78 ± 2.97	1.59 ± 1.28
M1-10	4.34 ± 3.82	3.88 ± 4.73
食塩水	5.02 ± 3.77	2.41 ± 3.24
M1+Tamiflu	4.27 ± 3.10	0.91 ± 1.25

10

下記の表 10 に示されるように、鼻洗浄液中のウイルス血症のピークは、1 日目に観察された。ウイルス感染の進行に対する鼻洗浄液回収の有害な影響を最小にするために、2、4、6 および 7 日目には鼻洗浄液を回収しなかった。A V I - 7 1 0 0 処置群において、食塩水またはオセルタミビルよりも有意な利益が観察された。A V I - 7 1 0 0 のみ (10 mg / kg) およびオセルタミビルのみの処置と比べて、A V I - 7 1 0 0 (10 mg / kg) とオセルタミビルとの併用によって相乗効果も観察された。ここで、併用 (A V I - 7 1 0 0 およびオセルタミビル) についての鼻洗浄液中のウイルス力価に対する A U C は、t a m i f l u のみの群と比べて 4 l o g 超の減少および食塩水群と比べて 3 l o g 超の減少を示す。その併用は、等量の A V I - 7 1 0 0 単独と比べてウイルス力価のいっそう大きな減少 (5. 5 1 5 という A U C から 2. 9 9 9 という A U C への減少) も示すことから、A V I - 7 1 0 0 が、オセルタミビルの抗ウイルス作用を増大させ得ると示唆される。本研究において使用されたウイルスが、別途オセルタミビルに耐性であるので、この結果は、驚くべきものである。

20

【0 3 1 1】

表 10 : ウイルス力価

【0 3 1 2】

【表 10】

30

群	平均 ± 標準偏差	3日目のピーク
Tamiflu	2.98 ± 2.71	7.91 ± 7.28
M1-30	2.78 ± 2.97	1.59 ± 1.28
M1-10	4.34 ± 3.82	3.88 ± 4.73
食塩水	5.02 ± 3.77	2.41 ± 3.24
M1+Tamiflu	4.27 ± 3.10	0.91 ± 1.25

40

実施例 3

スプライス部位を標的にするアンチセンスオリゴマーを用いた、組織培養物中のインフルエンザ A ウイルスの阻害

本発明のある態様は、M 1 / M 2 セグメント内の複数の部位のアンチセンス標的化によるインフルエンザ A ウイルス複製の阻害である。通常の M 1 / M 2 A U G 開始部位を標的にすることによる翻訳の阻害に加えて、スプライス供与部位およびスプライス受容部位もまた、本発明の化合物を用いて標的にされ得る。7 4 0 位のスプライス受容部位を標的にする 2 つの P M O を、ペプチド結合体化 P P M O である S A 7 4 0 および S A 7 4 6 (

50

それぞれ配列番号26および29)として合成し、H1N1 PR8株に対するインビトロ組織培養物複製系に入れた。そのPMOの3'末端に、P007細胞透過性ペプチド(配列番号118)を結合体化した。

【0313】

マウス肺胞マクロファージ細胞株(ATCC; AMJ2-C11)を0.1MOIでH1N1(PR8株)に感染させ、感染の1時間後にPPMOを加えた。細胞を35℃で一晩インキュベートした。次いで、ウイルス上清を取り、VNARプロテアーゼとともにインキュベートすることにより、ウイルスRNAを放出させた。HA RNAを定量的リアルタイムPCR(qRT-PCR)によって定量した。細胞を洗浄し、固定し、透過処理した。次いで、M1およびM2タンパク質を37℃において30分間、モノクローナル抗体でプロービングした。細胞を洗浄し、Alexa646に結合体化された抗マウスIgGを室温において15分間加えた。次いで、M1およびM2をフローサイトメトリーによってアッセイした。M1およびM2タンパク質のレベルを測定するために、M1またはM2陽性細胞のパーセントに、M1またはM2の平均蛍光強度(mean fluorescence intensity)を乗じた。次いで、各サンプルを未処置コントロールで除することにより、未処置のスクランブルコントロールに対するM1またはM2のパーセントを得た。

10

【0314】

図8Aは、ウイルスのHA RNAレベルの減少(qRT-PCRを用いて測定した)を示している。SA740とSA746の両方ともが、HA RNA生成を阻害したことから、スクランブルコントロールと比べてウイルス複製の阻害が示唆される。最も著明な作用は、10マイクロモル濃度において観察された(SA746を用いたときのおよそ2logの減少およびSA740を用いたときの1logの減少)。図8Bおよび8Cは、それぞれM1およびM2タンパク質レベルに対する、SA740およびSA746の作用を示している。上に記載されたフローサイトメトリー法を用いることにより、相対的なタンパク質レベルを測定した。両方のオリゴマーが、M2タンパク質の産生を阻害したのに対し、M1タンパク質のレベルは、SA740によって減少した。

20

【0315】

実施例4

ロックト核酸(NULCEIC ACID)オリゴマーを用いた、組織培養物中のインフルエンザAウイルスの阻害

30

本発明の化合物は、PMOとは異なる化学実体を含むオリゴヌクレオチドアナログを含む。M1/M2セグメントAUG開始部位領域を標的にする一連のロックト核酸を合成し(LNA-AUG1、LNA-AUG12、LNA-AUG13およびLNA-AUG10;それぞれ配列番号63、74、75および72)、上記の実施例3に記載されたようなウイルスRNAおよびM2タンパク質発現に対するアッセイと同じアッセイにおいて試験した。LNAオリゴマーの細胞内送達、裸の(gymnotic)送達(Stein, Hansenら、2010)を介した。AMJ2-C11細胞を、PR8に1時間感染させ、次いで、洗浄した。次いで細胞を、LNAまたは2'OMe化合物とともに96ウェルプレートにプレーティングし、35℃で一晩インキュベートした。ウイルスのRNAレベルおよびM2タンパク質の発現をその時点で評価した(約18時間という総インキュベーション時間)。図9Aは、ウイルスのRNAレベル(HAセグメント)に対する4つの異なるLNAの作用を示している。7.5マイクロモル濃度において、ウイルスのHA RNAレベルが、LNA-AUG12化合物の場合の約1.5log減少に対して、LNA-AUG1オリゴマーの場合、約3log減少した(それぞれ配列番号74および63)。LNA-AUG1は、20merであるのに対し、LNA-AUG12は、16merである。4つすべてのLNAオリゴマーに対して、長さに従った有効性の順位が存在することから、より長いLNAが、本発明の好ましい実施形態であることが示唆される。この関係性は、LNA-AUG1オリゴが、7.5マイクロモル濃度においてLNA-AUG10化合物と比べて最も有効である(それぞれ配列番号63および72)という、図

40

50

9 Bに示されるM2タンパク質発現の測定結果においても観察される。10塩基の標的化配列からなる相対的に短いLNA-AUG10化合物が、ウイルスのHA RNAアッセイとM2タンパク質発現アッセイの両方において最も有効性が低かった。

【0316】

実施例5

2'OMeオリゴマーを用いた、組織培養物中のインフルエンザAウイルスの阻害

本発明の化合物は、ホスホロチオエート結合によって連結された2'OMe残基からなるアンチセンスアナログオリゴマーも含む。3種の2'OMeオリゴである2'OMe-AUG1、2'OMe-AUG2および2'OMe-SA1；それぞれ配列番号12、20および26がIDTによって作製された。これらのオリゴマーは、M1/M2セグメントのAUG開始コドンまたはヌクレオチド740に位置するスプライス受容部位のいずれかを標的にするように設計された。2'OMe-SA1配列（配列番号26）は、上記の実施例3にSA740と記載されたPPMO化合物の配列と一致する。それらの2'OMe化合物を、上記の実施例3および4に記載されたようなウイルスのHA RNAレベルおよびM2タンパク質発現を阻害する能力に対するアッセイと同じアッセイにおいて試験した。細胞内送達、上記の実施例4においてLNAについて記載されたようなジムノシス（gymnosis）によって行われた。

【0317】

3種すべての2'OMe化合物が、図10Aに示されるように、7.5マイクロモル濃度における2.5〜4.5logというウイルスのHA RNAレベルの減少に有効だった。図10Bに示されるM2タンパク質測定アッセイにおいて、3種の化合物の相対的な有効性も観察された。最も有効な化合物は、AUG開始部位領域を標的にする2'OMe-AUG2の24mer（配列番号20）だった。下流のM1/M2スプライス受容部位を標的にする2'OMe-SA1オリゴマー（配列番号26）が同様に有効だった。

【0318】

実施例6

インビトロでのM1およびM2タンパク質発現の阻害

M1およびM2タンパク質の発現に対する本発明の例示的な化合物の作用を、処置され感染されたAMJ2-C11細胞のウエスタンブロット解析を用いて評価した。本発明の例示的なPPMO化合物（M1/M2PPMO；P007-M1/M2-AUG；3'末端において配列番号118に結合体化された配列番号12）を3マイクロモル濃度で用いて、MDC細胞を一晩処置した。続いて、それらの細胞をH1N1-PR8に0.01MOIで1時間感染させ、洗浄した。感染の18時間後に、細胞を溶解し、タンパク質を抽出した。M1、M2およびアクチンタンパク質と反応するモノクローナル抗体を用いる標準的な免疫ブロット（ウエスタン）アッセイによるその後の解析にむけて、等量のタンパク質をゲル上に充填した。図11に示されるように、M1タンパク質とM2タンパク質の両方の発現が、未処置コントロールおよび無関係のコントロールPPMO（デング）と比べて減少した。シグナル強度の解析から、図11に示されるように、M1タンパク質の発現よりもM2タンパク質の発現がM1/M2PPMOによって大きく阻害されることが示唆された（すなわち、M1の27%に対するM2の9%）。M1およびM2に対するシグナルの比較は、アクチンコントロールに対して正規化された。

【0319】

配列表

【0320】

【化 1 0】

<u>標的配列(5'から3')</u>	<u>配列番号</u>
AGCAAAAGCAGGUAGAUUUUAAAGAUGAGUCUUCUAACCGAGGUCGAAACGUACGUUCU	1
AAGCAGGUAGAUUUUAAAGAUGAGUCUUCUAACCGAGGUCGAAA	2
AGCAAAAGCAGGUAGAUUUUAAAG	3
CUUUAAUAUCUACCUUCUUUUGCU	4
AGCGAAAGCAGGUAGAUUUUGAAAGAUGAGUCUUCUAACCGAGGUCGAAACGUACGUUCU	5
AGCAAAAGCAGGUAGAUUUUGAAAGAUGAGUCUUCUAACCGAGGUCGAAACGUACGUUCU	6
AGCAAAAGCAGGUAGAUUUUGAAAGAUGAGCCUUCUAACCGAGGUCGAAACGUAGUUCU	7
AGCAAAAGCAGGUAGAUUUUGAAAGAUGAGUCUUCUAACCGAGGUCGAAACGUACGUUCU	8
AAAUUUGCAGGCCUACCAGAAACGAAUGGGAGUGCAGAUGCAGCGAUUCAA	9
AAAUUUGCAGGCCUACCAGAAGCGAAUGGGAGUGCAGAUGCAGCGAUUCAA	10
AGCGAAAGCAGGTAGATATTGAAAGATGAGTCTTCTAACCGAGGTCGAAACGTACGTTCTC TCTATCATCCCGTCAGGCCCCCTCAAAGCCGAGATCGCACAGAGACTTGAAGATGTCTTTG CAGGGAAGAACACCGATCTTGAGGTCTCATGGAATGGCTAAAGACAAGACCAATCCTGTC ACCTCTGACTAAGGGGATTTTAGGATTTGTGTTTACGCTCACCGTGCCAGTGAGCGAGGA CTGCAGCGTAGACGCTTTGTCCAAATGCCCTTAATGGGAACGGGGATCCAAATAACATGG ACAAAGCAGTTAAACTGTATAGGAAGCTCAAGAGGGAGATAACATTCCATGGGGCCAAAGA AATCTCACTCAGTTATTCTGCTGGTGCACCTTGCCAGTTGTATGGGCCTCATATACAACAGG ATGGGGGCTGTGACCACTGAAGTGGCATTTGGCCTGGTATGTGCAACCTGTGAACAGATTG CTGACTCCCAGCATCGGTCTCATAGGCAAATGGTGACAACAACCAACCCACTAATCAGACA TGAGAACAGAATGGTTTTAGCCAGCACTACAGCTAAGGCTATGGAGCAAATGGCTGGATCG AGTGAGCAAGCAGCAGAGGCCATGGAGGTTGCTAGTCAGGCTAGGCAAATGGTGCAAGCGA TGAGAACCATTGGGACTCATCCTAGCTCCAGTGCTGGTCTGAAAAATGATCTTCTTAAAA TTTGCAGGCCATCAGAAACGAATGGGGGTGCAGATGCAACGGTTCAAGTGATCCTCTCGC TATTGCCGCAAATATCATTGGGATCTTGCACTTGATATTGTGGATTCTTGATCGTCTTTTT TTCAAATGCATTTACCGTCGCTTTAAATACGGACTGAAAGGAGGGCCTTCTACGGAAGGAG TGCCAAAGTCTATGAGGGAAGAATATCGAAAGGAACAGCAGAGTGCTGTGGATGCTGACGA TGGTCATTTTGTGAGCATAGAGCTGGAGTAAAAAACTACCTTGTCTTCTACT	11
<u>オリゴマー標的化配列(5'から3')</u>	
CGGTTAGAAGACTCATCTTT	12
CGGT+TAGAAGAC+TCATC+TTT	13
AGAAGACTCATCTTTCAATA	14

【 0 3 2 1】

【化 1 1】

TTAGAAGACTCATCTTTCAA	15
CTCGGTTAGAAGACTCATCT	16
ATCTTTCAATATCTACCTGCTTTTG	17
CTCATCTTTCAATATCTACCTGCTT	18
CTCGGTTAGAAGACTCATCTTTCAA	19
ACCTCGGTTAGAAGACTCATCTTC	20
TCGACCTCGGTTAGAAGACTCATCT	21
TTTCGACCTCGGTTAGAAGACTCAT	22
AGCAAAAGCAGGTAGATATTGAAAA	23
AGCAGGTAGATATTGAAAAATGAGT	24
CTCCCATTCGCTTCTGGTAGGCCT	25
CACTCCCATTCGCTTCTGGTAGGC	26
TGCACTCCCATTCGCTTCTGGTAG	27
TCTGCACTCCCATTCGCTTCTGGT	28
CATCTGCACTCCCATTCGCTTCTG	29
AGCAAAAGCAGIGTAGATAATC	30
AGCAAAAGCAGIG+TAGA+TAA+TC	31
CGGATTGACATCCATTCAAATG	32
CGGAT+TGACA+TCCAT+TCAAATG	33
CTT+TCAA+TATCTACC+TGCTT	34
C+TCA+TCTTTCAA+TATCTACC	35
AC+TCA+TCTTTCAA+TATCTAC	36
GAC+TCA+TCTTTCAA+TATCTA	37
AGAC+TCA+TCTTTCAA+TATCT	38
AAGAC+TCA+TCTTTCAA+TATC	39
GAAGAC+TCA+TCTTTCAA+TAT	40
AGAAGAC+TCA+TCTTTCAA+TA	41

10

20

30

40

【 0 3 2 2】

【化 1 2】

TAGAAGAC+TCA+TCTTTCAA+T	42
T+TAGAAGAC+TCA+TCTTTCAA	43
GT+TAGAAGAC+TCA+TCTTTCA	44
TCGGT+TAGAAGAC+TCA+TCTT	45
CCTCGGT+TAGAAGAC+TCA+TC	46
GACC+TCGGT+TAGAAGAC+TCA	47
PNA 標的化配列	
CGGTTAGAAGACTCATCTTT	48
CGGTTAGAAGACTCATCT	49
CGGTTAGAAGACTCAT	50
AGAAGACTCATCTTCAATA	51
TTAGAAGACTCATCTTTCAA	52
CTCGGTTAGAAGACTCATCT	53
TCAATATCTACCTGCTTTTG	54
CTTTCATATCTACCTGCTT	55
AGCAAAAGCAGGTAGATATT	56
AGCAGGTAGATATTGAAAAA	57
CATTCGCTTCTGGTAGGCCT	58
CCCATTGCTTCTGGTAGGC	59
CTCCCATTCGCTTCTGGTAG	60
CACTCCCATTCGCTTCTGGT	61
TGCACTCCCATTCGCTTCTG	62
LNA 標的化配列	
CgGtTaGaAgAcTcAtCtTt	63
GaAgAcTcAt	64

10

20

30

40

【0 3 2 3】

【化 1 3】

GAaGaCtCAT	65	
GAAGACTCAT	66	
AGAAGACTCA	67	
TAGAAGACTC	68	
TTAGAAGACT	69	10
AAGACTCATC	70	
AGACTCATCT	71	
GACTCATCTT	72	
ACTCATCTTT	73	
CgGtTaGaAgAcTcAt	74	
GtTaGaAgAcTcAt	75	20
GTTAGAAGACT	76	
CATCTTTAAAT	77	
CaTcTtTaAaTaTcTaC	78	
CGGTTAGAAGACTCAT	79	
GGTTAGAAGACTCATC	80	30
GTTAGAAGACTCATCT	81	
TTAGAAGACTCATCTT	82	
TAGAAGACTCATCTTT	83	
AGAAGACTCATCTTTA	84	
GAAGACTCATCTTTAA	85	
AAGACTCATCTTTAAA	86	40

【 0 3 2 4】

【化 1 4】

AGACTCATCTTTAAAT	87
GACTCATCTTTAAATA	88
ACTCATCTTTAAATAT	89
CTCATCTTTAAATATC	90
TCATCTTTAAATATCT	91
CATCTTTAAATATCTA	92
ATCTTTAAATATCTAC	93
TCTTTAAATATCTACC	94
CTTTAAATATCTACCA	95
TTTAAATATCTACCAG	96
CgGgTaGaAgAcTcAt	97
GgTtAgAaGaCtCaTc	98
GtTaGaAgAcTcAtCt	99
TtAgAaGaCtCaTcTt	100
TaGaAgAcTcAtCtTt	101
AgAaGaCtCaTcTtTa	102
GaAgAcTcAtCtTtAa	103
AaGaCtCaTcTtTaAa	104
AgAcTcAtCtTtAaAt	105
GaCtCaTcTtTaAaTa	106
AcTcAtCtTtAaAtAt	107
CtCaTcTaTaAaTaTc	108

10

20

30

40

【 0 3 2 5】

【化 1 5】

TcAtCtTtAaAtAtCt	109
CaTcTtTaAaTaTcTa	110
AtCtTtAaAtAtCtAc	111
TcTtTaAaTaTcTaCc	112
CtTtAaAtAtCtAcCa	113
TtTaAaTaTcTaCcAg	114
<u>ペプチド配列</u>	
RRRQRRKKRC	115
RRRRRRRRRFFC	116
RRRRFFRRRRC	117
RAhxRAhxRAhxRAhxRAhxB	118
RRRRRRRRC	119
RRRRRRRRC	120
RRRRRRRRG	121
RRRRRRRRG	122
RAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhxB	123
RAhxRRBRRAhxRRBRAhxB	124
RARRARRARRRFFC	125
RGRRGRRGRGRFFC	126
RRRRRRRRRFFG	127
RRRRRRRRRFFAhxB	128

10

20

30

40

【図 1 A】

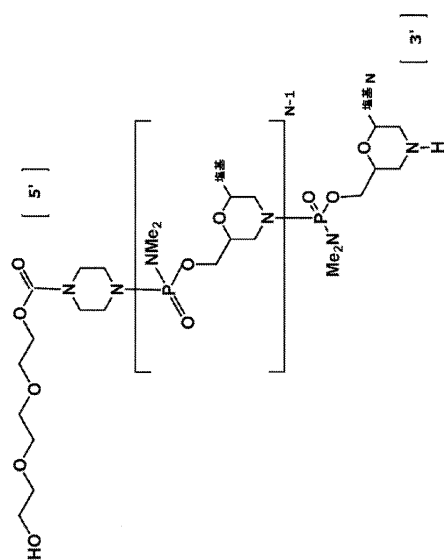


FIG. 1A

【図 1 B】

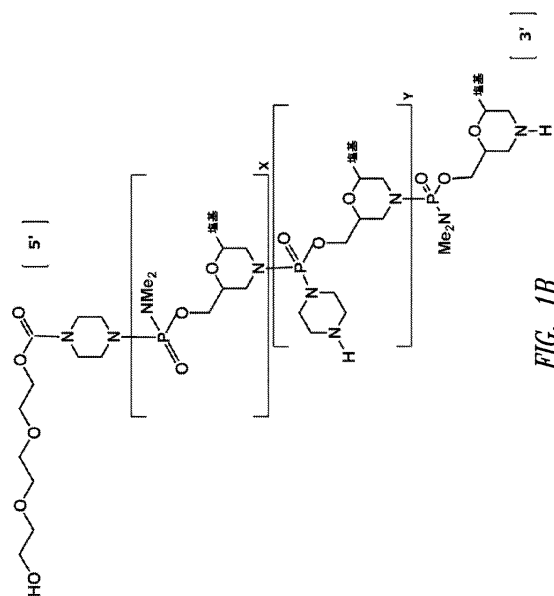


FIG. 1B

【図 1 C】

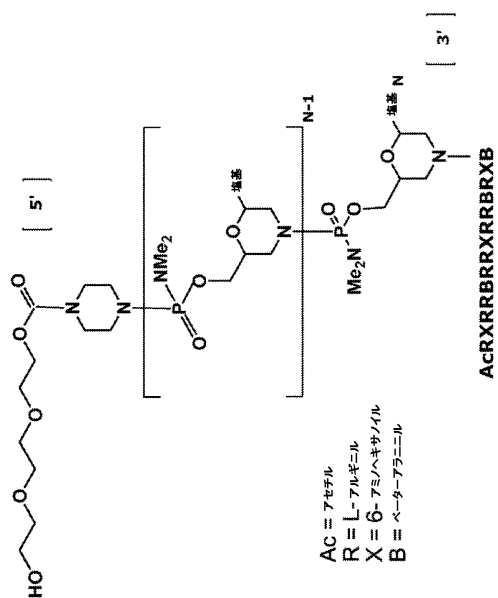


FIG. 1C

【図 1 D】

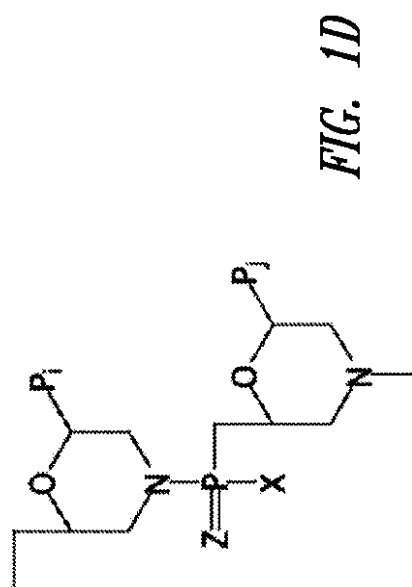


FIG. 1D

【図 1 E】

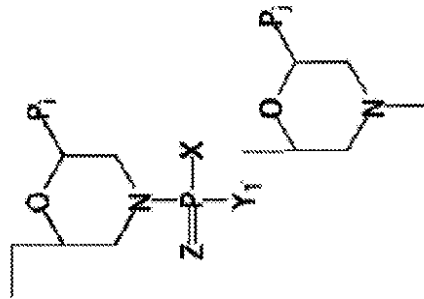


FIG. 1E

【図 1 F】

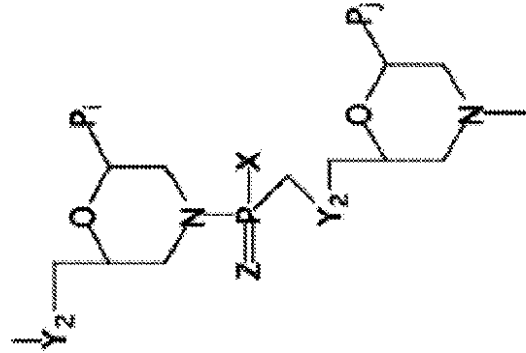


FIG. 1F

【図 1 G】

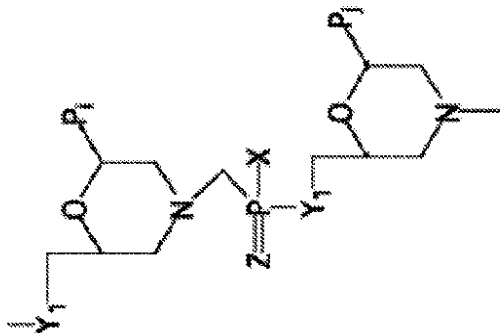


FIG. 1G

【図 2 - 1】

M1/M2-AUGplus

配列番号 13

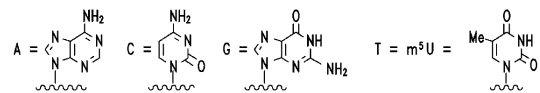
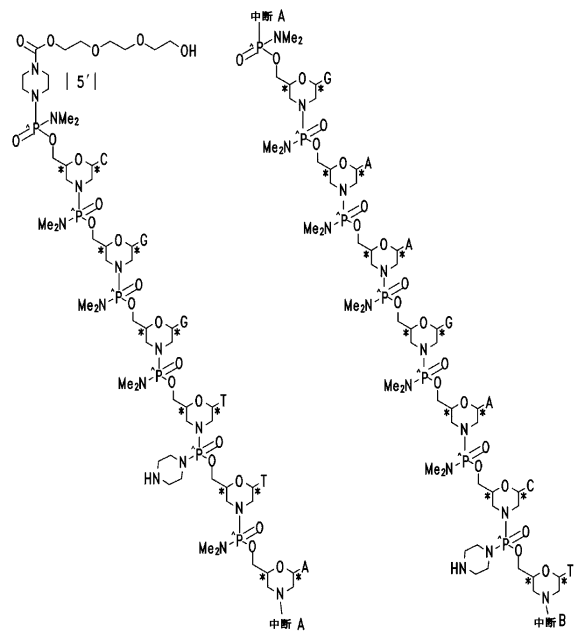


FIG. 2

【図 2 - 2】

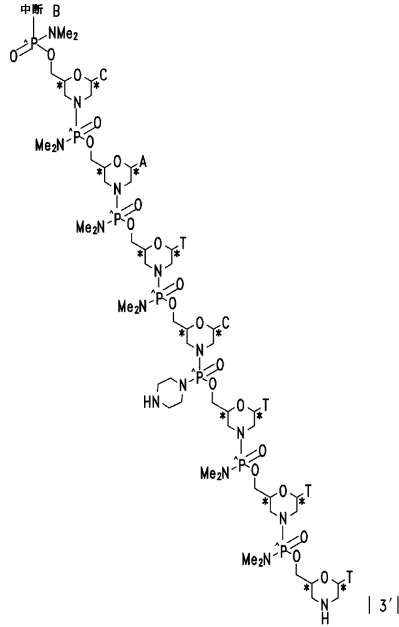


FIG. 2 (つづき)

【図 3】

インフルエンザRNA複製および標的化PMO

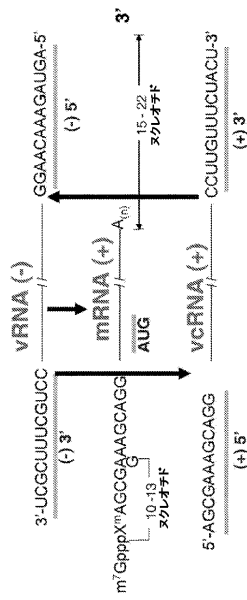
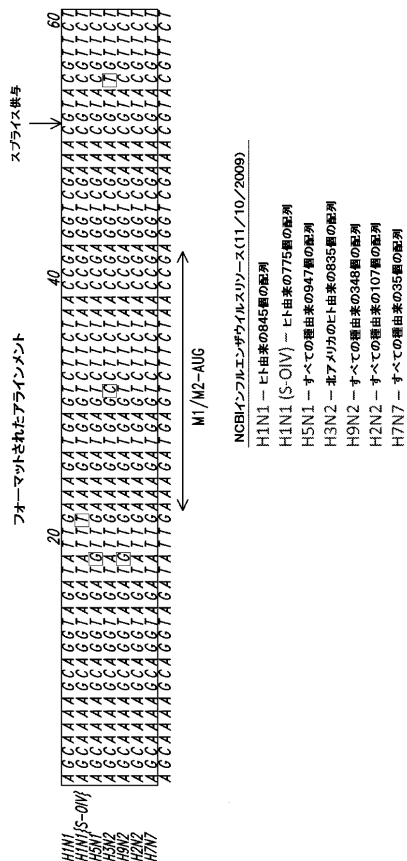


FIG. 3

【図 4】



【図 5 A】

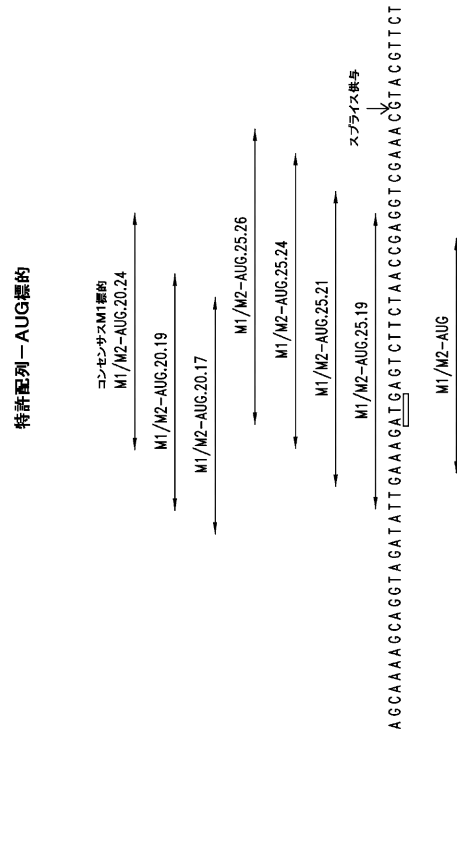


FIG. 5A

【図 5 B】

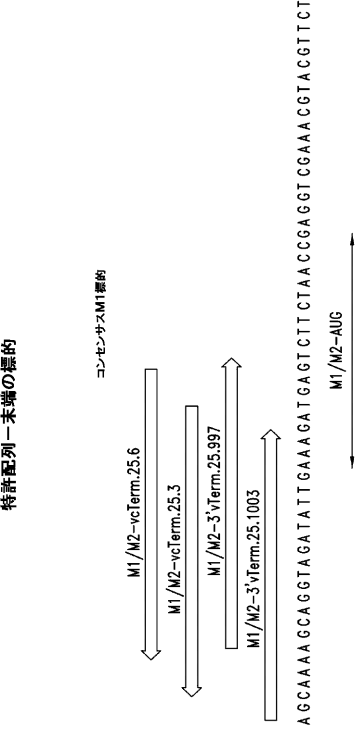


FIG. 5B

【図 6】

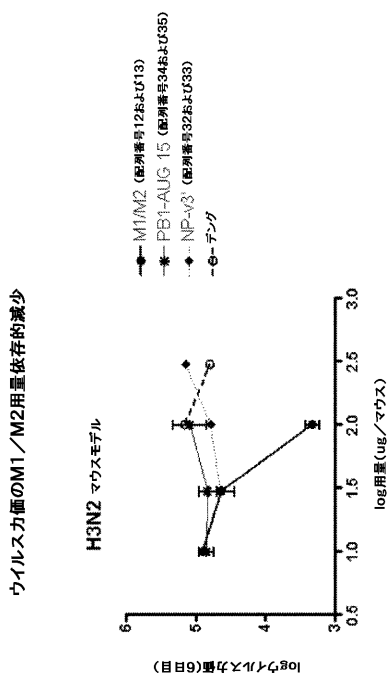


FIG. 6

【図 7 A】

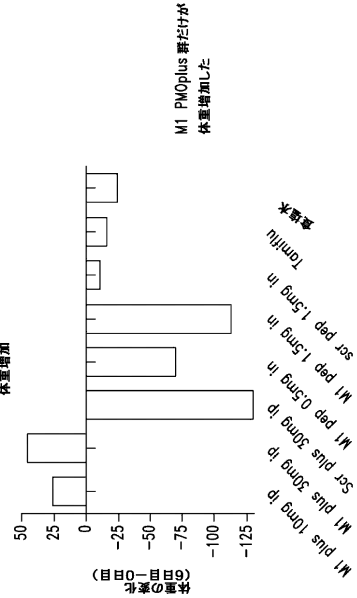


FIG. 7A

【図 7 B】

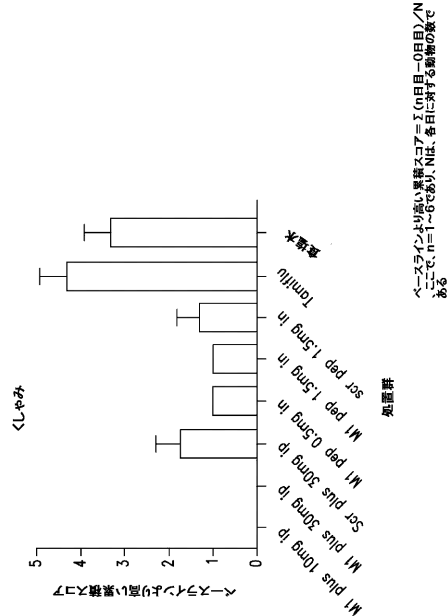


FIG. 7B

【図 7 C】

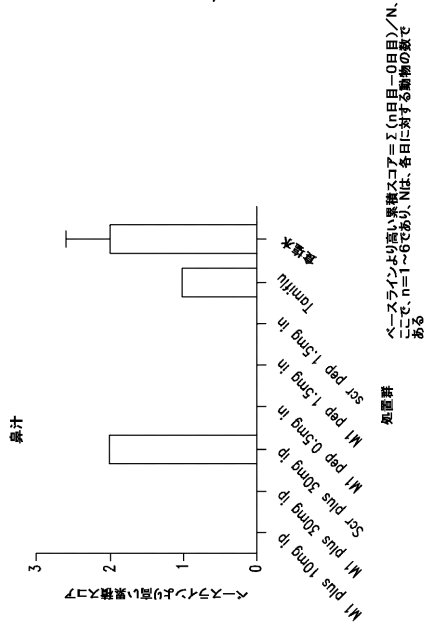


FIG. 7C

【図 7 D】

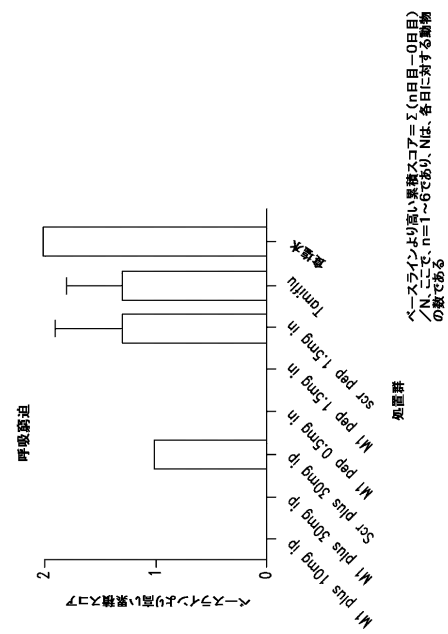


FIG. 7D

【図 7 E】

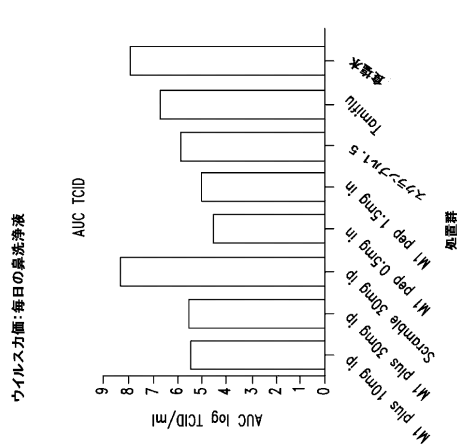


FIG. 7E

【図 8 A】

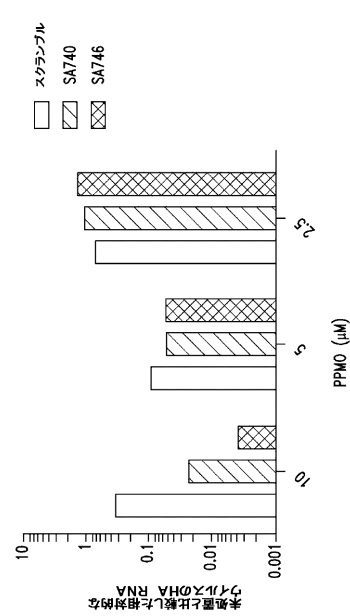


FIG. 8A

ウイルス方面: 毎日の鼻洗浄液

1日目から5日目
基礎水と比べて2.3~2.4logの減少
Tamifluに対して1.2~1.3log程度の減少

【図 8 B】

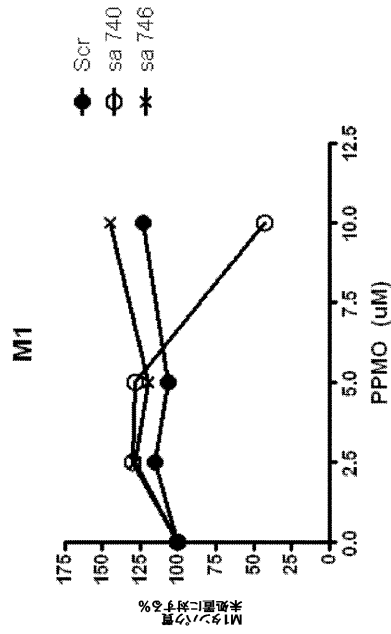


FIG. 8B

【図 8 C】

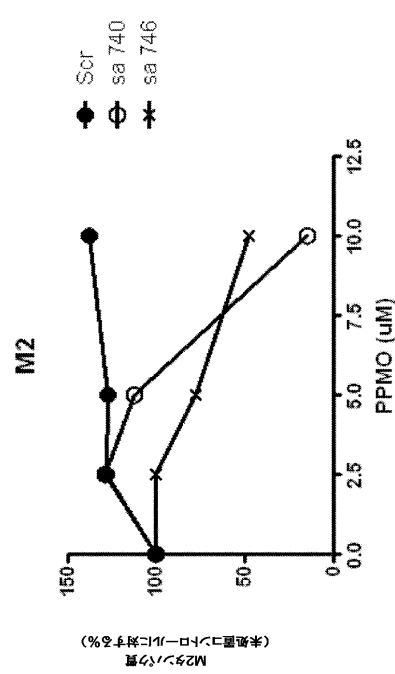


FIG. 8C

【図 9 A】

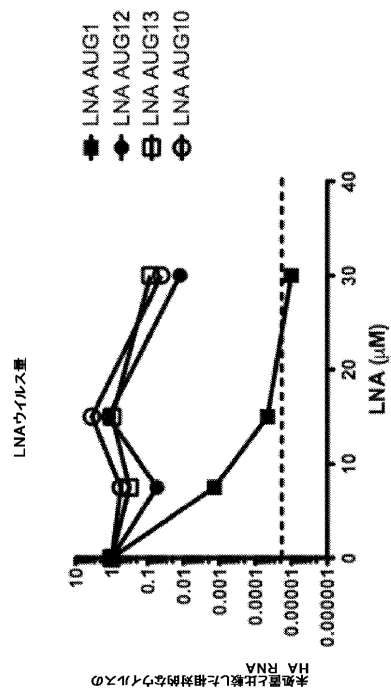


FIG. 9A

【図 9 B】

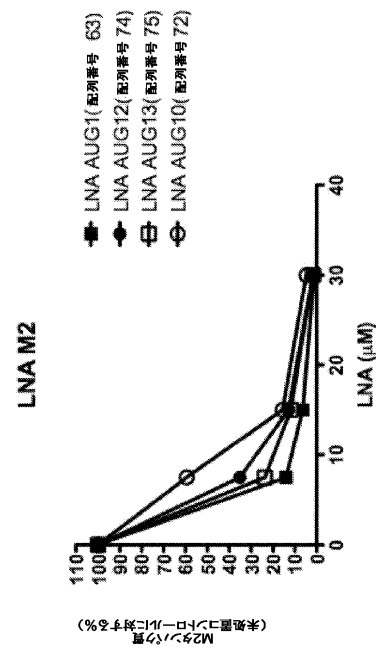


FIG. 9B

【配列表】

0005991922000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)		A 6 1 P 43/00	1 2 1
A 6 1 P 31/04 (2006.01)		A 6 1 P 31/04	
A 6 1 K 31/43 (2006.01)		A 6 1 K 31/43	
A 6 1 K 31/545 (2006.01)		A 6 1 K 31/545	
A 6 1 K 31/165 (2006.01)		A 6 1 K 31/165	
A 6 1 K 31/7056 (2006.01)		A 6 1 K 31/7056	

(31)優先権主張番号 61/377,382

(32)優先日 平成22年8月26日(2010.8.26)

(33)優先権主張国 米国(US)

前置審査

審査官 植原 克典

(56)参考文献 国際公開第2007/084359 (WO, A1)

特表平06-501843 (JP, A)

Journal of General Virology, 2008年, vol.89, pp.939-948

Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2006年, vol.50,no.11, pp.3724-3733

Molekulyarnaya Biologiya, 1991年, 25, 5, p.1332-7

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00

Caplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)